



UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

# Interacció de metalls pesants sobre els càlculs renals. Àrea d'estudi: Flix

---

*Projecte final  
Llicenciatura Ciències Ambientals*

**Jeroen de Bont  
4 de febrer del 2012**

**Dirigit per:**  
Montserrat López Mesas  
Francisco Blanco Lucena

## **Agraïments:**

Ha sigut un procés llarg però per fi ho he aconseguit, gràcies a l'ajuda de molta gent que està al meu voltant.

En primer lloc, vull agrair a tot el Grup GTS per acollir-me com un més i poder aconseguir fer aquest projecte. Sobretot, a les dues persones que m'han guiat en aquest estudi. Gràcies a Montserrat López Mesas, coordinadora del projecte, per ajudar-me en tot i tenir sempre la confiança en mi. I moltes gràcies al quasi doctor Francisco Blanco Lucena, una gran persona, sense la qual no hauria arribat on estic avui. En tot aquest temps m'ha ensenyat moltes coses del món de la química, però també he conegut un amic important, unes de les coses que més valoro de la meva estància al GTS. També a Manuel Valiente, director del GTS, per deixar-me utilitzar totes les instal·lacions del centre.

En segon lloc, vull donar les gràcies a Montserrat Garcia Vaquer, metgessa del CAP de Flix, per la seva col·laboració en l'estudi i per la seva efectivitat i rapidesa en la recollida de mostres en l'àrea de Flix.

En tercer lloc, molts agraïments a "Michi", Marina Casas Rojas, per estar allà sempre quan la necessitava i tranquil·litzar-me quan estava molt estressat. I sobretot, per ajudar-me millorar el meu català i els textos del projecte.

Finalment, gràcies a tots els voluntaris que han posat un granet de sorra al meu projecte, sense ells no hagués pogut entregar-lo. Gràcies a la Polaca, Pilie (quan encara hi eres) i a MON per animar sempre el laboratori. Un dia aconseguirem que els de davant nostre ens facin cas. També a tots els ambientòlegs que aquests mesos han estat al meu costat per alegrar-me el dia i els que també ho han fet, tot i estar viatjant. A totes les meravelloses persones com Sarai, Rosa, Gabriel, Izaias, Teresa, Maria, i molta més gent que he conegut aquestss anys en Barcelona. I per últim, a la meva família que, encara que estan tots molt lluny, sempre han estat interessats en el tema i m'han ajudat en el que han pogut.

# Índex

1.	Introducció: .....	1
1.1.	Metalls pesants al medi ambient: Zn, Cu i Pb .....	1
1.1.1.	Usos generals dels metalls en la indústria i incorporació al medi ambient. ....	1
1.1.2.	Reutilització de fangs d'EDAR a l'agricultura i absorció dels metalls presents per les plantes conreades.....	4
1.1.3.	Incorporació dels metalls al metabolisme humà. ....	6
1.2.	Càlculs renals. Influència de la presència dels metalls pesants. ....	8
1.3.	Cas real. Relació entre població exposada a Flix, zona de gran controvèrsia ambiental, amb població no exposada. ....	11
1.4.	Objectius.....	12
2.	Materials i mètodes. ....	14
2.1.	Definició dels criteris de mostreig d'orines reals.....	14
2.2.	Estudis in vitro amb orines artificials i reals sobre la influència dels metalls pesants sobre oxalat de calci i hidroxipatita. ....	15
2.3.	Tècniques analítiques.....	19
2.3.1.	Anàlisi de metalls: ICP-MS. ....	19
2.3.2.	Anàlisi de creatinina: espectrofotometria d'UV-Vis.....	22
2.4.	Expressió dels resultats.....	23
3.	Resultats i discussió .....	28
3.1.	Determinació de la influència de metalls sobre l'oxalat de calci i la hidroxipatita.....	28
3.2.	Explicació dels resultats de l'estudi de Flix .....	33
4.	Conclusions:.....	39
5.	Bibliografia: .....	41
6.	Annexos: .....	44
6.1.	Formularis i protocols: Formulari de primera comunicació, Certificat del comitè ètic, Protocol per als facultatius i Informació pels pacients .....	44
6.2.	Resultats: rectes de regressió .....	53
6.3.	Resultats: taules de dades .....	55

## **RESUM**

La litiasi renal (pedres de ronyó) és un desordre molt comú en països industrialitzats, als que aproximadament un 12% de la població desenvoluparà un càlcul renal al llarg de la seva vida. Aquestes xifres, però, varien molt en funció de diferents factors, com ara la zona geogràfica, el clima o l'alimentació.

A Espanya, la urolitiasi té una prevalença al voltant del 4% amb una taxa d'incidència del 0,27%, i es produeixen uns 105.000 nous casos cada any. D'aquests, aproximadament una quarta part necessitarà una actuació urològica. L'índex d'incidència més gran es dona entre els 30 i 60 anys, amb un clar predomini en els homes.

A més, s'ha vist una correlació en l'augment de la freqüència de pedres en països desenvolupats amb l'increment de la riquesa i de la despesa en aliments per càpita. En el present estudi, es vol determinar una possible correlació entre els metalls pesants i la formació de pedres de ronyó. Els metalls pesants que s'investiguen són: zinc (Zn), plom (Pb) i coure (Cu). Tots ells poden introduir-se al cos humà per la ingesta d'aliments que, al seu torn, poden incorporar-los a través de l'aigua o del sòl, factors directament dependents de la qualitat del medi ambient on es conreen.

### **1. Introducció:**

#### **1.1. Metalls pesants al medi ambient: Zn, Cu i Pb .**

“Metalls pesants” és el terme que s’aplica a un gran grup d’elements que són de gran importància industrial i biològica. Des d’un punt de vista químic, aquest grup d’elements es reconeixen amb una densitat atòmica major de  $6\text{g/cm}^3$ .<sup>1</sup> Alguns d’aquests metalls són considerats essencials per a la vida, i tenen com a funció catalitzar reaccions a nivell bioquímic. De fet, alguns metalls es troben en baixes concentracions a l’organisme i, tot i tenir una funció fisiològica desconeguda, són necessaris per la vida. Tanmateix, aquests es poden convertir en elements tòxics si superen aquest llindar de concentració.<sup>2</sup> Per tant, la presència de metalls pesants impliquen no només greus efectes en el medi ambient sinó també en la salut degut a exposicions cròniques. A diferència de molts compostos orgànics que es poden degradar en diòxid de carboni i aigua, els metalls pesants tendeixen a acumular-se en l’ambient i també en animals i plantes.<sup>3</sup>

##### **1.1.1. Usos generals dels metalls en la indústria i incorporació al medi ambient.**

###### **Zinc:**

És un dels elements més comuns de l’escorça terrestre (amb una concentració mitjana de  $70\text{mg/kg}$ )<sup>4</sup>, també el podem trobar a l’aire, al sòl i a l’aigua, i està present en tots els aliments. A causa de la seva reactivitat, el zinc metàl·lic no es troba com a element lliure en la natura; l’atmosfera oxidant de la terra fa que fonamentalment estigui formant part de compostos on té estat d’oxidació +II. Alguns dels seus compostos més representatius són clorur de zinc, òxid de zinc i sulfat de zinc.

Aquest element pot ser alliberat per processos naturals, però l’alliberació principal prové de fonts antropogèniques, sobretot de les activitats mineres i foneries de metalls. També poden ser alliberats per incineradores degut a la utilització de zinc en llautó, bronze, aliatges, cautxús i pintures. De fet, a causa de la descàrrega d’aquestes fonts les emissions al sòl són probablement la font més gran de zinc en el medi ambient.

---

A més, es pot quedar unit amb el sòl, sediments i partícules de pols. Els ions de zinc tenen poca mobilitat en el sòl, sobretot en sòls d'un pH 5 o més alt, ja que en aquestes condicions són fortament absorbits pels components del sòl. No obstant, depenent del tipus de sòl, alguns components de zinc es poden transportar a aigües subterrànies, llacs i rius.<sup>5</sup>

El zinc també és capaç de formar diferents complexos amb una gran varietat de grups orgànics i inorgànics. L'activitat biològica pot afectar a la mobilitat del zinc en ambients aquàtics, on es bioacumula moderadament en organismes aquàtics.

D'altra banda, la vegetació pot acumular nivells més alts de zinc si creix en sòls contaminats<sup>6</sup>. A més, s'ha vist que els fangs obtinguts per depuradores i el compost, que poden ser utilitzats en l'agricultura, tenen nivells alts de zinc<sup>5</sup>.

### **Plom:**

El plom no és particularment abundant, però els seus jaciments són de fàcil accés i es distribueix àmpliament a tot el món. Aquest metall és utilitzat a una extensa gamma de productes com ara canonades, soldadura, peces i bateries d'emmagatzematge, ja que té propietats atractives per aquests usos, com la resistència a la corrosió, densitat i baix punt de fusió.<sup>7</sup>

El plom entra a l'ambient de forma natural com a través dels volcans i en petites quantitats a l'escorça terrestre (sobretot en forma del mineral Galena, PbS), però la majoria prové de l'activitat humana, tant de la minera com de la fosa de minerals amb plom, així com també dels subproductes del plom. La font de contaminació més important d'aquest metall durant anys va ser la gasolina, que contenia com a additiu tetraetilplom. De fet, el 1984, aquest agent va ser responsable del 90% de totes les emissions antròpiques de plom (segons la EPA). Darrerament, però, el mercat d'aquest tipus de gasolina es va prohibir a Europa a partir de l'1 de gener del 2000 (Directiva 98/70/CE), mentre que a Espanya a partir del 1 de gener del 2002 (Reial Decret 403/2000).

Quan el plom és alliberat a l'aire, pot viatjar llargues distàncies fins que es diposita al sòl, on queda fortament adherit. Normalment el trobem en les capes superiors del sòl i quasi no lixiviat a capes més profundes ni a l'aigua subterrània. La part que sí que es filtra fins a capes inferiors depèn de les característiques del sòl i també del tipus de compost amb plom.<sup>7</sup>

A l'aigua hi pot arribar per les indústries d'acer i de ferro i per l'obtenció de plom metàl·lic. Una forma indirecta és l'escolament urbà i la deposició atmosfèrica. La solubilitat de plom en aigua depèn del pH (és soluble en condicions d'acidesa), de la duresa, de la salinitat i de la presència de materials húmics.

El plom és un element i no pot ser destruït, per tant, els seus compostos poden ser transformats en el medi ambient. Algunes d'aquestes substàncies són molt bioacumulables, es poden trobar concentracions molt altes de plom en el medi ambient, en alguns casos molt més que la permesa.<sup>7</sup>

### Coure:

Aquest metall es pot trobar de forma natural en tots els ambients, des de roques i sòls, fins a l'aigua i l'aire. Les fonts naturals inclouen volcans, vegetació en descomposició i incendis forestals, que poden generar pols amb contingut de coure que és arrossegada pel vent. D'altra banda, pel que fa a les fonts antropogèniques, el coure pot provenir de l'alliberació de les mines de coure i d'altres metalls, de l'agricultura, i d'altres fàbriques que fan i utilitzen aquest metall o d'altres compostos d'aquest. El coure també pot entrar al medi ambient pels abocadors de residus, les aigües residuals domèstiques, la combustió de combustibles fòssils i les deixalles, la producció de fusta, la producció de fertilitzants basats en fosfats i les fonts naturals.

Com la majoria de metalls, el coure no es troba aïllat a la natura, sinó combinat en forma de sals. Aquests compostos de coure es poden descompondre i alliberar coure lliure a l'aigua, aire i aliments. Quan el coure és alliberat al sòl, a les capes superiors d'aquest pot quedar fortament unit al material orgànic i altres components com argiles o sorres. Tot i això, una petita part del metall pot arribar a les aigües subterrànies.<sup>8</sup>

Pel que fa a l'aigua, el coure que és dissolt pot ser en la forma de coure lliure o compostos de coure, però la major part crea complexos amb els materials en suspensió. Encara que la major part es queda unit amb els sediments i materials en suspensió. El coure provinent de les fàbriques pot ser transportat per l'aire en forma de pols i pot tornar a la terra per efectes de la gravetat com la pluja o la neu. També podem trobar el coure en diferents concentracions en aliments i begudes.

### **1.1.2. Reutilització de fangs d'EDAR a l'agricultura i absorció dels metalls presents per les plantes conreades.**

En totes les fases de les estacions depuradores d'aigües residuals (EDAR) hi ha un tractament de fangs provinents de l'acumulació de matèries dissoltes i en suspensió que duu l'aigua residual a conseqüència dels seus usos. Aquests biosòlids tenen diferents destinacions finals com ara la valorització energètica o la disposició en dipòsits controlats, però una de les més importants és l'aplicació al sòl. La gran quantitat de nutrients i matèria orgànica que contenen els fangs els confereix un gran valor per l'agricultura<sup>9</sup>. No obstant, els diferents processos fisicoquímics i biològics que tenen lloc als EDARs, tendeixen a acumular metalls pesants als fangs provinents de les aigües residuals. Això explica que normalment es troben concentracions més altes als fangs que al sòl, que poden arribar a nivells tòxics. Un cop els metalls són absorbits al sòl es poden retenir indefinidament, però això ja depèn, entre altres factors, del tipus de sòl i també de la forma química del metall <sup>10</sup>. Per tant, per evitar que no es sobrepassin els nivells de toxicitat en els fangs, i que hagi una utilització segura a l'agricultura sense afectar als sistemes ecològics, durant les darreres dècades diferents països han impulsat diverses lleis per controlar la utilització de fangs<sup>11</sup>. Els valors que s'apliquen a l'Estat Espanyol són determinats pel Reial Decret 1310/1990, que regula la utilització de fangs de depuradores el sector agrari (taula 1), que relaciona les característiques del sòl i del contingut de metalls pesants al fang.



**Taula 1:** Valor límit de concentració dels metalls pesants que s'analitzen en aquest estudi en els fangs destinats a la seva utilització agrària<sup>12</sup>

Metall	Valor límit (mg/kg de matèria seca)	
	Sols amb pH menys de 7	Sols amb pH major de 7
Coure	1000	1750
Zinc	2500	4000
Plom	750	1200

És molt important conèixer la forma química del metall, ja que en depèn la mobilitat, la biodisponibilitat i fitotoxicitat. Pel que fa a aquestes dues últimes, l'absorció de metalls per les plantes suposa l'entrada d'aquests en la cadena alimentària. Sobretot en un sòl que ha estat recentment tractat amb fangs, l'equilibri bioquímic del sòl canvia i la biodisponibilitat dels metalls també pot canviar.<sup>13</sup> En l'estudi de P.S Hooda (1997), s'han detectat concentracions de metalls més altes dels valors permesos i, més concretament en els tres tipus de verdures analitzats (espinacs, pastanaga i blat), detectant concentracions més altes de metalls en zones contaminades que en zones no contaminades.

La marcada importància dels fets exposats a la societat, justifica el gran nombre i tipus d'estudis sobre aquest tema, dels que se'n desprèn que l'absorció de les plantes depèn molt de la forma química del metall, del tipus de sòl i del tipus de verdura. Hi ha algunes plantes que presenten mecanismes de defensa per tal de controlar l'entrada d'aquests metalls, i així eviten una potencial fitotoxicitat<sup>14</sup>.

S'han trobat altes concentracions de metalls pesants als fangs d'alguns embassaments, com el situat a la zona de Flix (apartat 1.3.). Això significa que l'aigua contenia concentracions de metalls pesants que poc a poc s'han unit a les partícules en suspensió (com pot passar amb el zinc, el coure i el plom, com s'ha descrit anteriorment). Com que a aquesta zona possiblement han utilitzat fangs de depuradores i s'ha regat amb aigua residual, es poden haver acumulat metalls pesants a les zones agràries de la regió i, en conseqüència, una major absorció de les verdures que la població ingereix produint l'entrada d'aquests metalls als humans. Donat el fet que la generació d'orina és el mecanisme animal bàsic per eliminar substàncies tòxiques solubles en aigua, es pot deduir que una ingesta elevada de metalls pesants

---

provoca un augment de la seva concentració en l'orina. És per aquest motiu que s'ha estudiat si aquesta absorció pot influenciar el risc urolitiàtic.

### **1.1.3. Incorporació dels metalls al metabolisme humà.**

#### **Zinc:**

El zinc és un nutrient essencial pels humans, però exposicions llargues de zinc poden ser perjudicials per la salut i poden provocar rampes estomacals, anèmia i canvis en els nivells de colesterol. Aquestes exposicions poden ser produïdes per l'alimentació, bevent aigua i respirant aire contaminat en llocs de treball.<sup>4</sup>

Per tant, l'exposició principal per a la població és per la ingestió. La ingesta mitjana de zinc a través d'aliments que realitzen els humans és de 5,2-16,2 mg/dia. Podem trobar aquest metall en tots els aliments, però és més present en aliments provinents d'animals, sobretot en el marisc. L'absorció de zinc dins del cos es produeix al llarg de l'intestí, encara que la major part de l'absorció es produeix en el duodè.<sup>15</sup>

També hi ha una exposició per inhalació de zinc i dels seus components, sobretot del tracte respiratori que malmet la funció pulmonar, provocant una reducció pulmonar i una disminució de la capacitat de difusió del diòxid de carboni. L'absorció de zinc depèn de la mida de les partícules i de la solubilitat de l'aerosol de zinc.

D'altra banda, no s'ha observat cap efecte tòxic en l'exposició de zinc i dels seus components en l'absorció dèrmica. Tampoc s'han trobat proves sòlides que indiquin que el zinc afecta la reproducció dels humans. Pel que fa l'efecte cancerós, s'ha classificat el zinc com grup D<sup>4</sup> (segons la EPA, Environmental Protection Agency), és a dir, no classificable com cancerigen per humans per la falta de dades.

#### **Plom:**

La incorporació del plom en el cos humà és el resultat de la inhalació (de la qual entre un 30 i 50% és absorbida a la circulació sanguínia), la ingesta d'aliments i d'aigua contaminants (entre un 8% i 15% d'absorció) i, en poques quantitats, del contacte amb

la pell.<sup>16</sup> Les quantitats i els efectes de la inhalació depenen sobretot de la mida de les partícules inhalades, però també d'altres factors, com ara l'edat o la velocitat de la respiració. Un cop absorbit per la sang, el plom es concentra sobretot en els eritròcits i es distribueix per l'organisme, localitzant-se inicialment en el ronyó i el fetge, i després en l'os, on es produeix l'acumulació més gran.<sup>17</sup> Per tant, el plom pot afectar de forma generalitzada a tots els òrgans i sistemes del nostre cos. El sistema més afectat és el sistema nerviós, tant en nens com adults. Exposicions molt llargues poden resultar en una disminució del rendiment en algunes proves que mesuren funcions del sistema nerviós

Pel que fa a la ingesta, la ràtio d'absorció gastrointestinal de plom inorgànic és influenciada pels estats fisiològics dels humans (p.e. edat, concentració de calci en sang, etc) i pels caràcters fisicoquímics de la ingesta (p.e. mida de partícules, solubilitat, etc)<sup>7</sup>. Pot provocar dolor abdominal, abundants vòmits o excrements negres, entre altres<sup>17</sup>.

### Coure:

El coure és un element essencial pels humans en petites quantitats. Hi ha diverses vies d'exposició, pel que fa a la ingesta quasi tots els aliments contenen coure (és possible ingerir aproximadament 1 mg/dia) però, sobretot, és realment perillós ingerir fungicides que continguin coure. L'altra via d'ingesta és l'aigua, que també pot causar problemes ja que es poden trobar altes concentracions de coure a causa de la composició de les canonades. S'absorbeix principalment a l'estómac i després es distribueix per tot l'organisme. S'emmagatzema, sobretot, en el fetge, el cor, el ronyó i els músculs.<sup>8</sup>

També hi ha una gran exposició en llocs de treball on es produeix coure, sobretot és perillós la inhalació de pols i fums i el contacte amb la pell. A més a prop de moltes fàbriques que produeixen coure, s'han trobat concentracions més altes d'aquest metall, les formes solubles del qual són les que presenten un major perill per a la salut, sobretot les sals utilitzades en l'agricultura.

**1.2. Càlculs renals. Influència de la presència dels metalls pesants.**

La generació de càlculs en el tracte urinari es denomina urolitiasi. Un càlcul és una estructura sòlida que s'origina com a conseqüència d'alteracions en el balanç fisicoquímic i/o urodinàmic de l'aparell urinari (per exemple, estancament de l'orina). La principal explicació sobre la formació d'un cristall i el seu creixement és el fenomen de sobresaturació de diverses substàncies en l'orina (promotors de la litiasi). L'excreció d'una quantitat excessiva d'aquestes espècies químiques o bé una diuresi insuficient poden fer que l'orina es trobi en condicions físiques de saturació. Aquest fet, unit a un pH determinat, permet la seva cristal·lització. Cal remarcar que la formació de concrecions sòlides està fortament influïda per l'absència d'inhibidors de la cristal·lització (p.e. citrat, glicosaminoglicans i diverses proteïnes com la proteïna Tamm Horsfall<sup>18</sup>), per la presència de substàncies promotores (p.e. ió calci, oxalat, àcid úric) i per factors relacionats amb la morfoanatomia renal. En condicions normals, tot i que l'orina es troba en un estat metastable (sobresaturat però estable temporalment), existeix un equilibri entre totes les substàncies i no es formen càlculs, però l'alteració d'aquest estat metastable pot portar a un episodi litiàsic.<sup>19</sup>

Per entendre els mecanismes de cristal·lització s'ha d'entendre el procés de formació de cristalls, els factors més determinants del qual es llisten a la taula 2. L'estat de saturació dels ions a una solució és un paràmetre termodinàmic que es defineix com el quocient del seu producte d'activitat iònic en solució i el seu producte de solubilitat termodinàmic (Kps). És a dir, un augment de la concentració dels promotors en orina superior al Kps anirà lligat a l'associació de petites quantitats de cristal·loides per formar un nucli (nucleació). Si les condicions són favorables, el nucli creix, podent-se adherir a la superfície interna del ronyó. Un cop arriba a una determinada dimensió crítica, el increment del seu volum és inevitable, es fa insoluble i amb el temps arribarà a una dimensió macroscòpica.<sup>20</sup>

**Taula 2:** Formació de càlculs renals<sup>18</sup>

<b>Mecanisme</b>	<b>Mediadors</b>
<b>Saturació/sobresaturació</b>	Hàbits i dieta/ alteracions genètiques
<b>Cristal·lització</b>	Inhibidors/ promotors
<b>Retenció cristalls</b>	Mida cristalls/ adherència cristalls/ inhibidors
<b>Formació de pedres</b>	Contínua retenció de cristalls

Hi ha diferents tipus de pedres d'acord amb la composició química principal del càlcul, es pot classificar en 6 grans grups generals:

- Litiasis d'oxalat de calci: constitueixen més del 70% dels càlculs generats en països industrialitzats. Es poden trobar en dues formes hidratades diferents que es diferencien pel nombre de molècules d'aigua d'hidratació de l'estructura: oxalat de calci monohidratat (COM), normalment amb una morfologia hexagonal i oxalat de calci dihidratat (COD) que precipita en forma de cristalls bipiramidals. El COD és la fase cinèticament més afavorida de l'oxalat de calci, i que en contacte amb la fase líquida es transforma gradualment en la forma monohidratada, que és l'estable. El COM es dona normalment en condicions de normocalciúria, (és a dir, excrecions urinàries normals de calci) associat amb un dèficit de capacitat inhibidora de la cristal·lització. D'altra banda, la formació de COD està afavorida en condicions de hipercalciúria (nivells elevats d'excrecions urinàries de calci), excrecions normals de citrat i un pH urinari  $\geq 6$ .

- Càlculs de fosfats: representen el 5-10% del càlculs, i es troben tant càlculs de fosfat càlcic format bàsicament de hidroxiapatita (HAP) com càlculs de brushita ( $\text{CaHPO}_4$ ). Aquests càlculs contenen una gran quantitat de matèria orgànica. Aquest tipus de càlculs es forma en espais confinats amb baixa eficàcia urodinàmica, es distribueixen petites partícules de matèria orgànica que sedimenten sobre la paret de la cavitat o la superfície interna del càlcul en desenvolupament. En condicions urinàries favorables ( $\text{pH} > 7$  i una baixa concentració de magnesi) aquesta capa gradualment calcificada per hidroxiapatita (HAP), dona lloc a un càlcul de HAP.

També es troben càlculs de fosfats no càlcics, com els càlculs d'estruvita, que representen aproximadament un 5% dels casos. Aquests són càlculs de HAP sobre els que precipiten cristalls de fosfat amònic magnèsic ( $\text{MgNH}_4\text{PO}_4$ ), derivat directament d'una activitat bacteriana anormalment alta. Aquest tipus

---

de litiasi està associada a la morbiditat substancial incloent hemorràgia, obstrucció i infecció urinària.

- Càlculs d'àcid úric: són pedres uniformes, rodones i ataronjades. La combinació d'una diüresi insuficient i pH àcid de l'orina com a principals factors, units a una dieta alta en purines, pot afavorir el creixement de càlculs d'àcid úric. Aquest tipus de pedres són aproximadament entre el 5-10% dels casos.
- Litiasis de cisteïna: aproximadament el 1% dels casos i són a causa d'una alteració genètica en el metabolisme d'aquest aminoàcid.
- Litiasis medicamentosa: també són aproximadament el 1% dels casos, que són produïts per la insolubilitat urinària d'alguns medicaments com el Indinavir usat en el tractament de la sida.

Els càlculs renals es poden formar per trastorns metabòlics, infeccions, influències hormonals, condicions de dieta i hàbits i la poca ingesta de líquids. No obstant, s'ha vist que l'orina pot contenir diferents components químics que poden prevenir la formació de cristalls. La gran dimensionalitat descrita per aquest sistema explica la gran variabilitat en la composició d'elements en les pedres reportada a la bibliografia<sup>21</sup>. A més, s'ha vist que en les darreres dècades la prevalença i la incidència de pedres de ronyó s'ha incrementat en els països industrialitzats com Estats Units, Europa, Japó, etc... Aquest fet s'associa fonamentalment a dos factors ambientals importants: d'una banda, la dieta, que en les darreres dècades ha evolucionat fins a augmentar la ingesta de promotors de la litiasi; de l'altra, el canvis en l'entorn, com el clima i la contaminació<sup>22</sup>.

Així mateix, s'han trobat com a elements traça en càlculs d'orina metalls pesants, encara que la seva funció en el procés litiàsic és discutida. Hi ha estudis que demostren que alguns metalls fan la funció de inhibidors de la formació de càlculs d'oxalat de calci en concentracions molt baixes, però també s'ha plantejat la hipòtesi que d'altres

poden actuar com promotors. A més, poden estar involucrats en la inducció cristal·lina depenent de la relació particular entre metalls i soluts.<sup>23</sup>

Fonamentalment hi ha interès a investigar la relació entre metalls divalents i els càlculs de calci (en forma d'oxalats o fosfats), ja que en tenir càrrega iònica com la del calci pot afavorir la substitució del calci per aquests ions metàl·lics.

Per tant, aquest treball es centra en l'estudi de la influència dels metalls  $Zn^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  i  $Cu^{2+}$  sobre la litiasi renal càlcica. D'aquesta manera, aquest estudi cobreix aproximadament el 80% de casos de litiasi renal.

### **1.3. Cas real. Relació entre població exposada a Flix, zona de gran controvèrsia ambiental, amb població no exposada.**

El municipi de Flix forma part de la comarca Ribera d'Ebre, a la província de Tarragona. Té 3961 habitants i ocupa una superfície de 166,9 km<sup>2</sup>.<sup>24</sup> L'origen del seu nom prové segurament del meandre agudíssim que envolta el poble. El territori comprèn la plana oligocènica de la Depressió Central.<sup>25</sup>

El clima de Flix és Mediterrani Continental Sec, amb una precipitació irregular i amb una total anual escassa<sup>26</sup>, concretament, la precipitació mitjana és d'uns 367 l/m<sup>2</sup> (n= 30 anys). L'estació més plujosa és la tardor i la que menys l'estiu. El règim tèrmic es caracteritza pels estius calorosos i els hiverns moderats, de fet, la temperatura mitjana de les màximes de juliol és de 33 °C, mentre que la mitjana de les mínimes de gener és de 2°C<sup>27</sup>.

Els usos del sòl es poden observar a la taula 3 i, pel que fa a la vegetació, hi ha un predomini de les comunitats vegetals de carrascar o alzinar continental, màquia continental, sureda i alzinar típic, els quals corresponen a un paisatge de terra baixa<sup>28</sup>.

El motor econòmic del municipi és la indústria Electroquímica de Flix S.A. (Ercros). L'agricultura, en canvi, té molt poca importància. Predomina l'agricultura de secà,

concretament el conreu d'oliveres, el qual ha adquirit un cert potencial de desenvolupament en les darreres dècades.

**Taula 3:** Cobertes del sòl del municipi de Flix<sup>29</sup>

Bosc					Improductiu		Conreus	Total
Dens	Clar	Matollars	Prats	Altres	Natural	Artificial		
2972ha	384ha	3243ha	7ha	1ha	177ha	135ha	4711ha	11639ha

L'empresa Ercros va ser fundada el 1898 per l'empresa alemanya *Chemische Fabrik Elektron i Elektrizitäts*, que va ser la primera planta electrolítica de tot l'Estat (i tercera d'Europa). Va començar amb 90 treballadors i el 1960 va arribar a tenir 1508 treballadors<sup>30</sup>. Principalment posseïa 3 línees de processos productius: va començar amb l'obtenció del clor alcalí pel blanqueig del sector tèxtil, tot i que després aquesta producció es va refocalitzar incloent altres sectors industrials (per exemple, en la fabricació de DDT o dels PCB). També produïen fosfat càlcic pel pinso en l'alimentació animal. Durant tot el segle XX aquesta planta ha abocat al riu tot tipus de contaminants com ara fluorurs o múltiples metalls pesants, entre els quals s'ha trobat zinc. Així doncs, entre la construcció de la presa de Flix (1949) i la construcció de la presa de Riba-Roja (1960) s'han acumulat tot tipus d'elements nocius pel medi ambient. En 1994 el CSIC va impulsar diverses recerques, en les quals van descobrir l'existència de metalls pesants i compostos organoclorats persistents als fangs de l'embassament<sup>31</sup>.

Aquestes investigacions van tenir una gran atenció mediàtica arreu del país i, conseqüentment, ja s'han començat diverses neteges dels fangs de l'embassament per conservar l'entorn. Efectivament, s'han trobat tot tipus de metalls pesants als fangs d'aquesta àrea, alguns dels qual es podrien trobar també en l'orina i afectar al risc de la urolitiasis.

#### **1.4. Objectius.**

Com hem comentat anteriorment, durant les darreres dècades s'ha vist un augment del risc litiàsic en els països industrialitzats i, per tant, cada cop hi ha un interès



---

científic més important per tal de reduir la taxa d'incidència i recidiva d'aquest desordre, així com les despeses derivades als serveis de sanitat. Malgrat el gran nombre d'actuacions que s'han dut a terme per poder reduir la concentració de metalls pesants al medi ambient, encara hi ha llocs on es continuen acumulant molts metalls, com per exemple a Flix. Ja que es tracta d'elements bioacumulatius, pot ser que en aquests casos la ingesta sigui massa alta i, consegüentment, influeixin en el risc litiàsic.

Per tant, la finalitat d'aquest projecte és conèixer millor els efectes que poden produir la presència dels metalls pesants sobre la litiasi renal. Així doncs, els objectius d'aquest estudi són els següents:

- Determinar la influència de la presència de metalls pesants en el creixement cristal·lí de substàncies litògenes *in vitro*.
- Determinar la presència de metalls pesants com Zn, Cu i Pb en orina i la seva influència en el risc litogènic.
- Realitzar un estudi per observar i analitzar la quantitat de metalls pesants en la orina dels habitants de l'àrea exposada de Flix (casos), i comparar-la amb els habitants de fora de l'àrea de Flix que en representaran els controls, per tal de determinar si la diferència en la composició de l'orina és significativament diferent a les dues zones esmentades.

### **2. Materials i mètodes.**

#### **2.1. Definició dels criteris de mostreig d'orines reals.**

En aquest apartat es descriu tot el procés que s'ha dut a terme per obtenir les mostres d'orina per realitzar l'estudi.

Els participants han de complir els següents requisits :

- Criteris d'inclusió dels Casos: Edat entre 30-65 anys i residència dintre l'àrea de Flix
- Criteris d'inclusió dels Controls: Edat entre 30-65 anys i residència fora de l'àrea de Flix
- Criteris d'exclusió: Incapacitat física per participar en l'estudi.

Els participants, han de signar un consentiment conforme estan d'acord a participar en l'estudi de forma voluntària, que responen lliurement al formulari, accedeixen a recollir i entregar l'orina acumulada durant el període nocturn (0h-8h aproximadament) i han d'estar informats dels mètodes i objectius generals de la investigació.

D'altra banda, el GTS (Grup de Tècniques de Separació en Química) mantindrà l'anonimat de les persones que han participat en aquesta recerca, i la confidencialitat de les dades que se'n derivin. A més, les dades obtingudes només s'utilitzaran amb finalitat científica i en cas que els participants ho desitgin, seran informats dels objectius concrets i dels resultats de la investigació, una vegada hagi finalitzat.

Per tal de simplificar al màxim la logística relativa a la recollida de mostres, es planteja emprar com a punt de recollida d'orines de l'àrea de casos exposats el Centre d'Atenció primària (CAP) de Flix. D'altra banda, els controls seran realitzats per voluntaris de l'àrea metropolitana de Barcelona.

Així doncs, va ser necessari contactar amb el CAP per demanar la seva col·laboració a aquest estudi. Aquest procediment requereix del certificat del Comitè Ètic d'Investigació Clínica (CEIC) de l'IDIAP Jordi Gol<sup>32</sup> (Institut Universitari d'Investigació en Atenció Primària).

Per tal de satisfer els requisits demanats per aquest organisme es van redactar el protocol de l'estudi, el full d'informació pels pacients i un formulari de primera comunicació (tots aquests documents es poden veure a l'Annex 6.1.). L'estudi proposat va ser avaluat el 19/12/2012 i aprovat el dia 07/01/2013. Immediatament es va informar a la metgessa de família voluntària del CAP de Flix per tal de començar la recollida de mostres segons s'especifica al protocol.

Tant pels casos com pels controls, s'agafarà una mostra d'orina nocturna, que és la més adequada per aquest tipus de diagnòstic, ja que es troba molt concentrada i assegura detectar alguns productes químics i elements formats, que en forma diluïda no els podríem detectar<sup>33</sup>. De fet, el risc litogen augmenta durant la nit, de manera que es pot assumir que aquestes són les condicions més extremes a les que l'orina d'un pacient es pot veure sotmesa. En aquestes mostres s'analitzaran els metalls Zn, Pb, Cu i creatinina per tal de normalitzar els resultats, com s'exposa a continuació.

### **2.2. Estudis in vitro amb orines artificials i reals sobre la influència dels metalls pesants sobre oxalat de calci i hidroxiapatita.**

#### **Orines artificials:**

A continuació es descriu el procés per poder conèixer la influència d'aquest metalls pesants sobre el risc urolitiàtic. En primer lloc, es realitzen unes incubacions amb les quals es treballa amb orina artificial<sup>34</sup> amb propietats de sobresaturació, que es prepara abans de la seva utilització, mesclant volums iguals de les solucions A i B descrits en la taula 4. La solució resultant imita la composició mitjana de tots els ions implicats en l'orina humana. Les dues solucions són preparades per dissolució dels corresponents reactius en aigua milli-Q i s'ajusta a un pH 5,5.

**Taula 4:** Composició de les dues solucions usades per formar l'orina artificial

Solució A (g/l)		Solució B (g/l)	
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4.86	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	2.40
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.02	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	3.00
NH <sub>4</sub> Cl	4.65	NaCl	13.12
KCl	12.2	Na <sub>2</sub> C <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	0.075
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	2.24		

S'introdueixen 10ml de cada solució A i B a un erlenmeyer de 25mL. A més, s'afegeix una "llavor" o punt de nucleació en forma de pols de 0,150g d'oxalat de calci (COM) o hidroxiapatita (HAP).

La HAP és un reactiu comercial (Fluka), mentre que el COM s'ha preparat al laboratori adaptant la metodologia descrita per J.A. Wesson<sup>35</sup>. Per fer-ho, s'addiciona gota a gota, simultàniament, 100ml de CaCl<sub>2</sub> 0,2 M amb 100 ml de Na<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 0,2M en 300ml d'aigua. Un cop mesclades totes dues solucions es filtra el precipitat i es recullen es cristalls d'oxalat de calci format. Aquest sòlid es renta amb aigua i es deixa durant la nit a l'estufa per evaporar tota l'aigua.

Finalment també s'afegeix un inhibidor que es troba ja de forma natural dins l'orina, aquest és el citrat, que actua dins l'orina disminuint la sobresaturació urinària d'oxalat i fosfat càlcic mitjançant la formació de complexos solubles amb calci<sup>36</sup>. A més, degut a les seves propietats àcid-base, ajuda a regular el pH de l'orina. D'aquest inhibidor, se n'afegeixen 176 ppm. El volum afegit de citrat, 150 µL, no modifica de manera important la concentració de la resta d'analits. Finalment s'afegeixen diferents concentracions dels metalls pesants d'interès, que es troben dintre de les concentracions habituals d'aquests en la orina. La taula 5 resumeix els resultats de l'estudi consultat<sup>37</sup> i en la figura 1 una visió sobre el procediment de les incubacions.

**Taula 5:** Procés d'elecció de concentració dels metalls analitzats, seguint l'estudi ref 37.

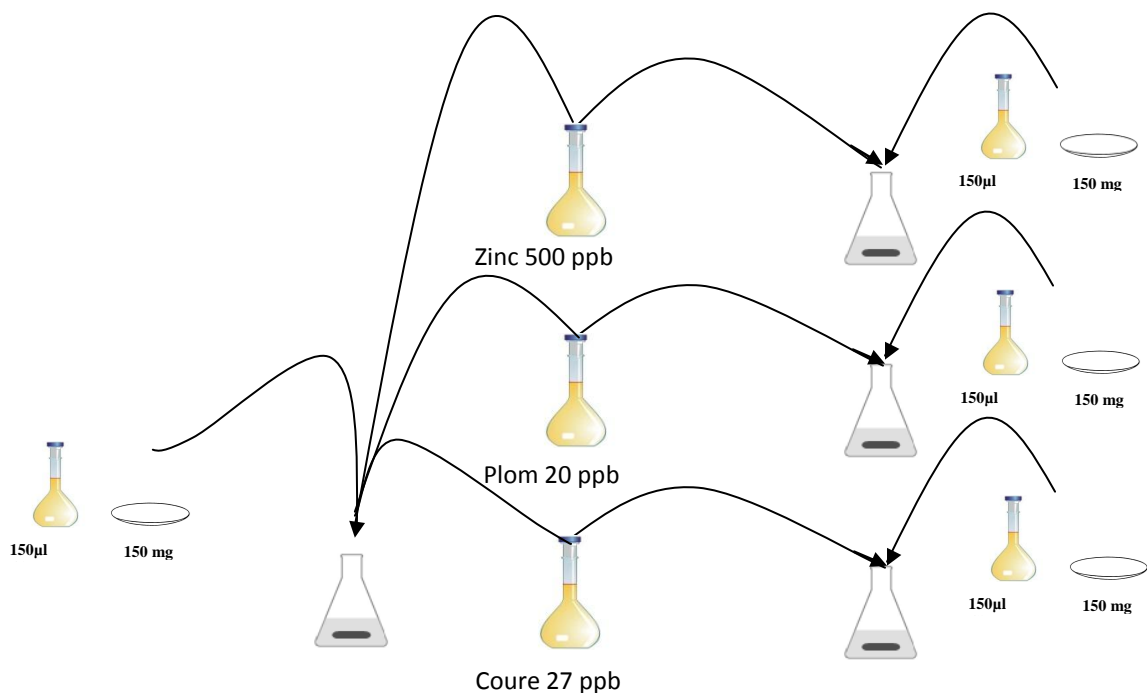
Element	Nombre de subjectes	Rang de concentracions (ppb)	Concentració elegida (ppb)
<b>Zinc</b>	683	266-846	500
<b>Plom</b>	456	12-27	20
<b>Coure</b>	507	4,2-50	27
<b>Crom</b>	879	0,04-1,5	1

Per cada metall s'ha fet una incubació per duplicat i també una incubació per duplicat amb els 4 metalls junts, per determinar si els metalls poden tenir una interacció sinèrgica o si actuen individualment. A més s'han fet 4 blancs:

- Blanc només amb orina i agitant.
- Blanc dorina amb COM o HAP i agitant.
- Blanc només amb orina i sense agitar.
- Blanc dorina amb COM o HAP i sense agitar.

El procediment descrit s'ha fet per tal de poder quantificar la precipitació d'oxalat de calci o HAP respecte l'orina sense llavor, atenent al fet que l'orina es troba sobresaturada normalment, i això dóna lloc a precipitació. Aquest valor es fa servir com a referència de precipitació a la resta de sistemes.

Les incubacions amb agitació s'agiten amb un agitador magnètic durant 24h a 37°C, que és aproximadament la temperatura del nostre cos, per tal que l'experiment tingui les condicions més properes a la realitat. L'agitació es fa per afavorir la interacció entre la "llavor", els metalls pesants i l'orina.



**Figura 1:** Procediment de les incubacions.

Un cop passades les 24h s'agafen uns 10 ml de cada incubació mitjançant una xeringa (BD Discardit 10ml), es filtren (filtres Millipore 0,22µm) per tal d'eliminar els possibles cristalls i s'analitza la concentració de metall mitjançant ICP-MS (aquest procés s'explica a l'apartat 2.3.)

### **Estudi amb orines reals:**

Un cop estudiats els efectes dels metalls pesants en orines artificials, s'estudiarà l'efecte del zinc sobre l'oxalat de calci i la hidroxiapatita en orines reals. Així, es pot aconseguir una aproximació més real de les incubacions anteriors, ja que s'utilitza directament orina real. Fent això es podrà observar com influeix la complexa matriu de l'orina, que inclou proteïnes, hormones i altres metabòlits, en els processos litiàtics. Per exemple, com hem comentat a la introducció, l'orina conté diversos tipus d'inhibidors de la cristal·lització, mentre que en les incubacions amb orina artificial només s'hi havia afegit citrat com a inhibidor.

Per la realització d'aquests experiments, s'ha escollit treballar només amb el zinc, que és el metall que es troba en una concentració més gran en comparació amb els altres i, per tant, té una potencial influència més gran a la cristal·lització en orines reals. Una altra raó per la qual tan sols treballem amb zinc es que en les incubacions artificials va tenir una influència apreciable en la cristal·lització del calci.

Per tant, l'única diferència en aquestes incubacions respecte les anteriors, és que al tenir un volum limitat d'orina recollida, es treballa amb només 10ml d'orina per cada incubació, s'afegeix 0,075g d'oxalat de calci o hidroxiapatita i 500ppb de zinc, però no s'afegeix citrat, ja que l'orina ja conté habitualment una quantitat similar a l'afegida a les orines artificials. Igual que els altres experiments, les mostres s'incuben agitant durant 24h a 37°C . Un cop passat aquest temps es filtra la mostra, es fa una dilució 1:10 i es determina el contingut en metalls (ICP-MS) i en creatinina (espectrofotometria). També es va preparar per cada mostres dos blancs: un blanc sense cap llavor i un altre blanc amb la llavor però sense cap addició de zinc.

Les orines reals amb les quals s'ha treballat han estat els controls de l'estudi de Flix que s'especifica a l'apartat (2.1.).

### **2.3. Tècniques analítiques**

#### **2.3.1. Anàlisi de metalls: ICP-MS.**

S'analitzen les mostres per determinar les composicions químiques i concentracions dels analits amb la metodologia analítica més adient. Concretament, per determinar els metalls pesants en aquest estudi, es treballa amb un equip d'Espectrometria de Masses amb Plasma d'Acoblament Inductiu (Sigles en àngles: Inductively coupled plasma - mass spectrometry, ICP-MS). El instrument utilitzat en les anàlisis és un ICP-MS THERMO SCIENTIFIC XSERIES 2. Mentre que la creatinina s'utilitza un espectrofotòmetre UV-Vis (Novaspec II)

La tècnica del ICP-MS consisteix en la nebulització d'una mostra líquida per aconseguir la posterior atomització, que permet transformar la composició de la mostra en un flux d'ions. Aquest flux és separat segons la relació massa/càrrega mitjançant un analitzador de ions (en el nostre cas, un quadrupol). Un cop separats, els ions incideixen al detector en què es recompta el nombre d'ions o es mesura la corrent iònica produïda quan els ions formats hi incideixen.<sup>38</sup>

La tècnica bàsica consisteix en introduir una mostra líquida, que és bombejada a una velocitat aproximada de 1mL/min per una bomba peristàltica, en un nebulitzador, on és convertit en un aerosol amb gas argó (aproximadament 1L/min)<sup>39</sup>. Aquest aerosol passa a la torxa<sup>40</sup>, que està format per tres tubs concèntrics de quars a través dels qual flueixen corrents d'argó a una temperatura d'uns 10.000K. Aquest núvol d'argó a alta temperatura és el plasma, en el si del qual la mostra es desolvata, volatilitza, dissocia, atomitza i ionitza. Aquest procés es fa en una interfase que separa la zona de pressió atmosfèrica (zona del ICP) de la zona d'alt buit (espectròmetre de masses). Un cop passat el plasma, els ions travessen l'orifici del con de mostreig fins a una zona de menor pressió (aproximadament 2 mbar), per després travessar un segon element mostrejador (anomenat con skimmer) i arribar a un sistema de lents. Tots aquests passos es fan per enfocar millor el feix d'ions fins l'analitzador i eliminar les

molècules neutres presents al feix gràcies al camp electrostàtic que generen. Després del sistema de lents de focalització es troba el quadrupol, que té la funció de filtrar els ions. En cada instant, l'aplicació d'un voltatge determinat provoca que únicament els ions amb una determinada relació massa/càrrega ( $m/z$ ) puguin mantenir una trajectòria estable dintre de l'analitzador que els permet arribar al detector de masses, el qual està format per un multiplicador d'electrons de díodes discrets dissenyats per a la detecció d'ions positius<sup>40</sup>. Cada díode es manté a un potencial més alt que l'anterior i emet ràfegues d'electrons quan ions o electrons d'elevada energia incideixen sobre la seva superfície. El funcionament d'aquest tipus de detector permet obtenir respostes en el rang dels nanosegons<sup>38</sup>.

Els grans avantatges d'aquesta tècnica són el fet de tenir un límit de detecció molt baix (al rang de les ppt), un alt grau de selectivitat i la seva gran precisió i exactitud. El interval de massa analitzable és entre 3 i 300, i permet obtenir espectres senzills i fàcils d'interpretar. Un dels principals inconvenients de la tècnica és el seu cost, tant d'adquisició, com de funcionament i manteniment. Un altre problema important és l'existència d'interferències que puguin afectar l'anàlisi de determinats anàlits i alguns tipus de mostres. Aquesta interferència espectroscòpica és provocada quan una espècie iònica en el plasma té els mateixos valors de  $m/z$  que l'anàlit. Sobretot pot estar provocada pel solapament d'isòtops amb la mateixa relació  $m/z$  però corresponents a diferents elements (el cas típic és el  $^{40}\text{Ar}^+$  interfereix amb  $^{40}\text{Ca}^+$ ) o a ions poliatòmics, que són interaccions entre les espècies del plasma i les espècies de la matriu o de l'atmosfera (en aquest estudi el  $(^{23}\text{Na}-^{40}\text{Ar})^+$  interfereix amb el  $^{63}\text{Cu}^+$ ). Un altre inconvenient és quan s'analitzen mostres amb una matriu complexa apareix l'efecte matriu en que per la mateixa concentració d'anàlit, l'anàlisi d'una mostra real o d'una dissolució estàndard de l'anàlit pur no proporciona la mateixa resposta instrumental.<sup>41</sup>

D'altra banda, hi ha diferents mètodes per evitar aquests últims dos inconvenients. En general, es centren en la manipulació de les mostres: dilució de la mostra per tal de reduir l'efecte matriu o addició d'un patró intern.



En la taula 6 es descriuen les condicions d'operació instrumental del sistema de ICP-MS utilitzat, un cop optimitzades, i en taula 7 s'indica quins isòtops s'han utilitzat en aquest estudi, la seva abundància en la naturalesa, el límit de detecció calculat a partir de les rectes de regressió amb patrons ((veure resultats dels calibratges al punt 6.2 dels annexos)) d'aquests i les possibles interferències espectroscòpiques. De fet, s'ha escollit el  $^{65}\text{Cu}$  i el  $^{66}\text{Zn}$  que, tot i no ser els isòtops més abundants en la naturalesa (que són el  $^{63}\text{Cu}$  i  $^{64}\text{Zn}$ ), permeten minimitzar les interferències espectroscòpiques. Durant les primeres proves s'ha vist que altres components en les mostres, com el sodi, provoquen interferències amb aquests components i no donaven resultats fiables. En canvi, el  $^{208}\text{Pb}$  no presenta interferències importants als casos estudiats.

**Taula 6:** Condicions d'operació instrumental del sistema de ICP-MS.

<b>Sistema ICP</b>	
Potència del generador	1400 W
Flux de gas auxiliar	0,80 l/min
Flux de gas de refrigeració	13,0 l/min
Flux de gas de nebulització	0,9 l/min
<b>Sistema d'introducció de mostra</b>	
Velocitat de la bomba peristàltica	30 rpm
Temps d'estabilització	60 segons
Temps de rentat	80 segons
<b>Paràmetres d'adquisició de dades</b>	
Analitzadors	Quadrapol
Númers d'escombrats	35
Númers de replicats	3
Temps de lectura	24 segons

**Taula 7:** Isòtops utilitzat en els anàlisis.

<b>Isòtop</b>	<b>Abundància</b>	<b>Límit de detecció (ppb)</b>	<b>Interferències espectroscòpiques</b>
$^{44}\text{Ca}$	2,13%	406,27	$^{17}\text{OH}+^{27}\text{Al}(99.7\%)$ , $^{40}\text{Ar}+^4\text{He}(99,6\%)$ , $^{12}\text{C}+^{32}\text{S}(94,0\%)$ , $^{16}\text{O}+^{28}\text{Si}(92.0\%)$
$^{65}\text{Cu}$	30,8%	0,35	$^{14}\text{N}+^{51}\text{V}(99.4\%)$ , $^{17}\text{OH}+^{48}\text{Ti}(73.3\%)$ , $^1\text{H}+^{64}\text{Zn}(48.9\%)$ , $^{40}\text{Ar}+^{25}\text{Mg}(10.1\%)$
$^{66}\text{Zn}$	27,9%	1,46	$^{14}\text{N}+^{52}\text{Cr}(83.5\%)$ , $^1\text{H}+^{65}\text{Cu}(30.9\%)$ , $^{40}\text{Ar}+^{26}\text{Mg}(11.2\%)$
$^{208}\text{Pb}$	52,4%	0,15	$^{16}\text{O}+^{192}\text{Os}(40.9\%)$ , $^{17}\text{OH}+^{191}\text{Ir}(38.4)$ , $^{14}\text{N}+^{194}\text{Pt}(32.7\%)$ , $^{40}\text{Ar}+^{168}\text{Er}(27.0\%)$ , $^{12}\text{C}+^{196}\text{Pt}(25.1\%)$ , $^1\text{H}+^{207}\text{Pb}(21,1)$

En primer lloc s'han analitzat les solucions incubades. Les mostres in vitro no s'han pogut analitzar directament a l'ICP-MS, perquè la concentració de sodi a les dissolucions era massa alta, de manera que s'observava un efecte matriu, com bé s'ha explicat anteriorment. Per aquesta raó s'han diluït les mostres 1:10 i s'ha afegit un

patró intern format per indi (In), gal·li (Ga) i escandi (Sc). A continuació, s'han analitzat les mostres amb la tècnica ICP-MS fent un calibrat dels metalls ( $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  i  $\text{Cu}^{2+}$ ) entre 0,1ppb i 10 ppb pel Cu i Pb, i entre 0,1 ppb i 60 ppb pel zinc. Finalment, pel  $\text{Ca}^{2+}$  entre 7,5ppm i 15ppm.

Pel que fa a les incubacions d'orines reals també s'ha realitzat una dissolució 1:10 però només s'ha analitzat zinc i calci, d'acord amb la descripció experimental exposada a l'apartat 2.2. A més, el calibrat de calci s'ha allargat fins a 60 ppm per adaptar-lo a la concentració de calci de les mostres, superior als estudis amb orina artificial.

### **2.3.2. Anàlisi de creatinina: espectrofotometria d'UV-Vis.**

La creatinina és un producte de la degradació del fosfat de creatina en el múscul, produït pel cos constantment<sup>42</sup>, i que està acceptat com a marcador de la funció renal. Aquest metabòlit es determina per tal d'ajustar la concentració dels metalls a la concentració de creatinina en orina, amb l'objectiu d'eliminar la influència de les diferències individuals en la dilució d'orina<sup>43</sup>. La determinació es fa pel mètode més reconegut a nivell mundial, la reacció colorimètrica de Jaffé<sup>44</sup>.

La tècnica colorimètrica es basa en el fenomen d'absorció de radiació de certs compostos. Aquest fet té una relació lineal amb la concentració de l'espècie absorbent a la solució i la distància que travessa la llum a través d'aquesta. El màxim d'absorció es situa a una energia diferent, pel que convé establir la longitud d'ona adequada a cada anàlisi. En el cas que ens ocupa, es treballa en la regió visible.

Aquesta consisteix en la reacció d'àcid pícric en medi bàsic amb dues molècules de creatinina que fan canviar el color de la reacció d'un color groguenc a un color vermellós, i s'analitzarà amb un espectrofotòmetre. En aquest estudi es va tenir com a referència l'adaptació del mètode realitzada per Harry Hudson i Abraham Rapoport<sup>45</sup>. Es va treballar amb una longitud d'ona de 485nm que és aproximadament la màxima absorció del complex creatinina-picrat i el blanc de la reacció Jaffé. Es realitza un calibrat amb diferents concentracions de creatinina. S'ha treballat entre 0 i 50 ppm ja

que a concentracions més altes es perd la linealitat i les mesures són poc fiables (veure resultat del calibratge al punt 6.2 dels annexos).

Experimentalment, primer es mesura l'absorbància del dissolvent (el blanc) per tal que l'absorbància sigui zero. A continuació es posa la mostra sense reactiu en una cubeta i es mesura la seva absorbància<sup>46</sup>, que servirà per corregir l'absorbància mesurada en les mostres un cop han reaccionat amb el reactiu colorimètric. Per fer-ho, s'afegeixen 50 µl de la mostra d'orina i s'enrasa amb aigua Milli-Q fins a 1,5 ml, després s'afegeix 0,5 ml de NaOH 1M per tal de basificar el medi ja que aquesta reacció es produeix en medis molt bàsics. Finalment, s'afegeix 0,5 ml de 0,00066M d'àcid pícric i després de 20 minuts exactes es mesura la seva absorbància. Això es fa perquè es una reacció lenta i per tant s'ha d'esperar aquest temps perquè la reacció sigui més completa. Un cop mesurades les absorbàncies, es calculen els grams de creatinina per litre d'orina.

#### **2.4. Expressió dels resultats**

Després de mesurar les concentracions de  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ , i  $\text{Ca}^{2+}$  en les orines, les dades s'analitzen i expressen com es descriu a continuació.

Pel que fa al calci, es mesura la quantitat d'aquest que ha precipitat en cadascuna de les mostres, calculant el percentatge de la influència del metall, que fa referència a la precipitació de calci després de la incubació. Es pot expressar de la següent manera:

$$\% \text{ influència del metall} = \left( \frac{[\text{Ca}](\text{blanc}) - [\text{Ca}](\text{mostra})}{[\text{Ca}](\text{blanc})} \right) \times 100$$

**Equació 1:** L'equació per calcular el % de l'efecte promotor de la cristal·lització.

On:

- $[\text{Ca}](\text{blanc})$ = és la concentració de calci en ppm en el blanc amb la llavor però sense haver afegit el metall
- $[\text{Ca}](\text{mostra})$ = és la concentració de calci en ppm després de la incubació amb la llavor i afegint una concentració de metall

El percentatge d'efecte del metall s'ha descrit d'aquesta forma, ja que podem saber de manera simplificada si el calci que hi havia a la solució d'orina ha cristal·litzat o no.

Si obtenim un percentatge de promotor del 0% significa que hi ha la mateixa concentració de calci en el blanc que a les mostres. En altres paraules, significa que els metalls no afecten al procés litiàsic. En canvi, un valor positiu (calci dissolt a la mostra < calci dissolt al blanc) significaria que els metalls faciliten la formació de cristalls de sals de calci i que, conseqüentment, augmenta el risc litiàsic. En canvi, si té un valor negatiu (calci dissolt a la mostra > calci dissolt al blanc), significa que els metalls inhibeixen la formació de cristalls de calci, i per tant, hi ha un menor risc litiàsic (menor risc de formació de pedra).

D'altra banda, pel que fa als metalls es calcula el percentatge de pèrdua del metall de la solució per determinar si els metalls romanen dissolts a l'orina o s'adhereixen als cristalls. S'ha calculat segons indica l'equació 2:

$$\% \text{ de pèrdua del metall} = \left( \frac{Me (afegit) - Me (mostra)}{Me (afegit)} \right) \times 100$$

**Equació 2:** L'equació per calcular el % de pèrdua del metall en les incubacions.

A on:

- *Me (afegit)* = és la concentració del metall en ppb que s'afegeix abans de començar l'incubació.
- *Me (mostra)* = és la concentració del metall en ppb després de la incubació.

D'aquesta manera, com més alt és el valor del % de pèrdua del metall, menys metalls hi ha després de la incubació i, per tant, es conclou que el metall ha precipitat amb l'oxalat de calci o la hidroxiapatita. Juntament amb el percentatge d'efecte promotor es podrà observar si, en el cas que el metall precipiti, aquest inhibeix o facilita el procés litiàsic.

Amb totes les mostres d'orina, tant pels casos com pels controls, es determinarà la concentració de Ca, Cu, Zn i Pb en l'orina. Aquesta determinació servirà per determinar si hi ha una diferència significativa en la composició de l'orina entre les dues àrees, i si això podria influir en el risc litiàsic.

Un cop determinada la concentració de creatinina es poden normalitzar els resultats obtinguts de les anàlisis de metalls com s'indica a les següents fórmules.

Aquesta normalització fa que no sigui necessari recollir tot el volum d'orina nocturna, amb els avantatges que aquest fet comporta, com s'ha comentat anteriorment.

$$\text{Concentració metall} = \frac{\text{metall } (\mu\text{g})}{\text{orina(l)}}$$

$$\text{Concentració Creatina} = \frac{\text{creatinina(g)}}{\text{orina (l)}}$$

$$\text{Metall normalitzats} = \frac{\text{metall } (\mu\text{g})}{\text{creatinina (g)}}$$

**Equació 3:** Equacions utilitzats per normalitzar la creatinina.

D'altra banda, les orines reals contenen zinc, però es vol comprovar l'efecte inhibidor de la cristal·lització només del zinc afegit. Per determinar aquest efecte cal treballar amb les concentracions de calci tal i com mostra l'equació 4. Aquesta expressió resta la concentració de calci a la incubació amb zinc afegit, la corresponent a la incubació sense zinc afegit, i normalitza aquesta diferència respecte una referència (absència de metall).

$$\% \text{ influència del zinc} = \left( \frac{[\text{Ca}]_{\text{amb Zn i amb llavor}} - [\text{Ca}]_{\text{només llavor}}}{[\text{Ca}]_{\text{només llavor}}} \right) \times 100$$

**Equació 4:** L'equació per calcular el % de l'influència del zinc sobre la cristal·lització de calci

A on:

- $[\text{Ca}]_{\text{amb Zn i amb llavor}}$  = vol dir la concentració de calci en ppm trobat després d'incubar l'orina afegint la llavor i el 500ppb de zinc.
- $[\text{Ca}]_{\text{només llavor}}$  = vol dir la concentració de calci en ppm trobat després d'incubar l'orina afegint la llavor però no el metall

Si obtenim un percentatge d'influència del 0% significa que hi ha la mateixa concentració de calci en el blanc que a les orines amb addició de zinc. En altres paraules, significa que el zinc no afecta al procés litiàsic. En canvi, un valor negatiu significaria que els metalls faciliten la formació de cristalls de sals de calci i que, consegüentment, augmenta el risc litiàsic. En canvi, si té un valor positiu, significa que

els metalls inhibeixen la formació de cristalls de calci (es dissol la llavor), i per tant, hi ha un menor risc litiàsic.

Pel que fa el zinc es calcula el percentatge de pèrdua per veure si roman dissolt a l'orina o s'adhereix als cristalls. Com les orines ja contenen una concentració inicial de zinc s'ha de tenir en compte aquest valor. S'ha calculat segons indica l'equació 5:

$$\% \text{ de pèrdua del zinc} = \left( \frac{[Zn](afegit) + [Zn](natural) - [Zn](mostra)}{[Zn](afegit) + [Zn](natural)} \right) \times 100$$

**Equació 5** L'equació per calcular el % de pèrdua del zinc en les incubacions reals.

On:

- $[Zn](afegit)$  = la concentració de zinc (ppb)afegit abans d'incubar
- $[Zn](natural)$ = la concentració de zinc natural (ppb) present en l'orina
- $[Zn](mostra)$  = la concentració final de zinc (ppb) després d'incubar

D'aquesta manera, quan la pèrdua del zinc s'aproxima més al 0 %, significa que la concentració de zinc no canvia després de la incubació i, per tant, no s'ha precipitat amb l'oxalat de calci o la hidroxiapatita. Juntament amb el percentatge de pèrdua del metall es podrà observar si, en el cas que el metall precipiti, aquest inhibeix o facilita el procés litiàsic.

Finalment també s'ha fet un percentatge per tal d'observar l'efecte de posar un punt de nucleació de HAP o COM a l'orina sense afegir zinc:

$$\% \text{ influència amb llavor} = \left( \frac{[Ca]llavor - [Ca]blanc}{[Ca]blanc} \right) \times 100$$

**Equació 6:** L'equació per calcular el % de l'influència de la presència d'una llavor sobre la cristal·lització de calci

A on:

- $[Ca]llavor$  = vol dir la concentració de calci en ppm trobat després d'incubar l'orina afegint la llavor
- $[Ca]blanc$  = vol dir la concentració de calci en ppm trobat després d'incubar l'orina sense llavor.

D'aquesta manera si hi ha un percentatge negatiu, significa que el calci precipita amb la presència d'una llavor. Això pot ser interessant per la gent que ja conté càlculs per veure que pot passar amb el calci quan ja tens un càlcul

Amb les incubacions artificials s'han fet per duplicat mínim i per tant els resultats s'expressen com la mitjana amb la seva desviació estàndard expressada als gràfics com a barra d'error.

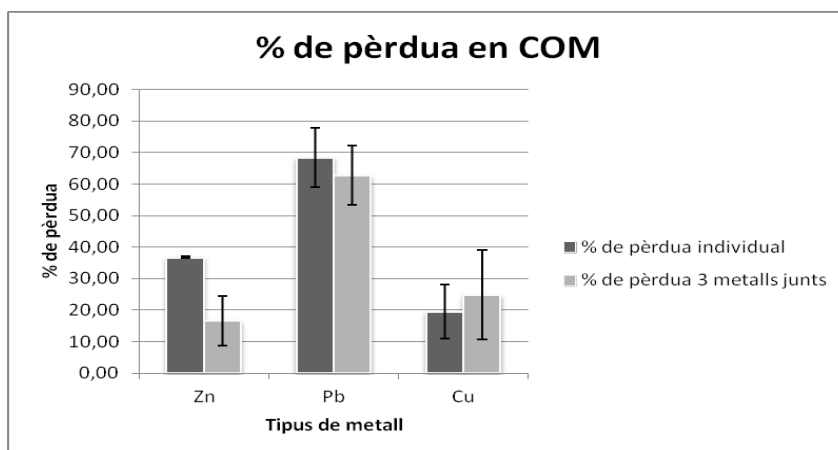
Amb aquests resultats podrem relacionar les dues zones geogràfiques de l'estudi. A més, segons els resultats obtinguts a les incubacions, es podrà determinar si les persones més exposades a aquests agents tenen més possibilitat de patir pedres de ronyó.

### 3. Resultats i discussió

#### 3.1. Determinació de la influència de metalls sobre l'oxalat de calci i la hidroxiapatita.

##### Incubacions orines artificials amb oxalat de calci:

En la figura 2 (a partir de l'equació 2) es poden observar els percentatges de pèrdua dels metalls, tant de la incubació individual com de la incubació amb els tres metalls junts en presència de cristalls de COM.

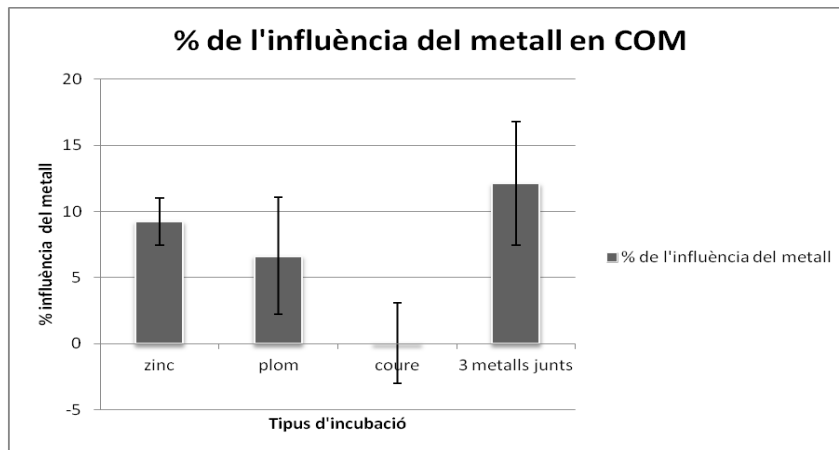


**Figura 2:** % de pèrdua dels metalls.

Es pot veure, en general, que les pèrdues són semblants per a cada metall en les dues situacions (individuals o conjunts). Tot i així, el zinc tendeix més a formar cristalls individualment que no pas quan es troba amb els altres metalls. També s'observa que el coure té un percentatge de pèrdua molt baix, fet del que se'n desprèn que no té tanta afinitat d'adherir-se a la xarxa cristal·lina de l'oxalat de calci. Pel que fa el plom, s'observa que clarament hi ha una alta pèrdua d'aquest element en els dos casos

D'altra banda, la figura 3 mostra el percentatge de la influència dels metalls sobre la precipitació de l'oxalat de calci. Les dades mostrades han estat calculades a partir de mesures de la concentració de calci a les mostres, tal i com indica l'Equació 1. A aquesta figura, podem veure com el zinc i el plom tenen una forta influència en la cristal·lització de calci individualment, com demostren els valors positius. És a dir, hi ha menys calci després de la incubació, ja que aquest ha quedat cristal·litzat en forma d'oxalat de calci. El coure no té una influència detectable en la formació de cristalls.



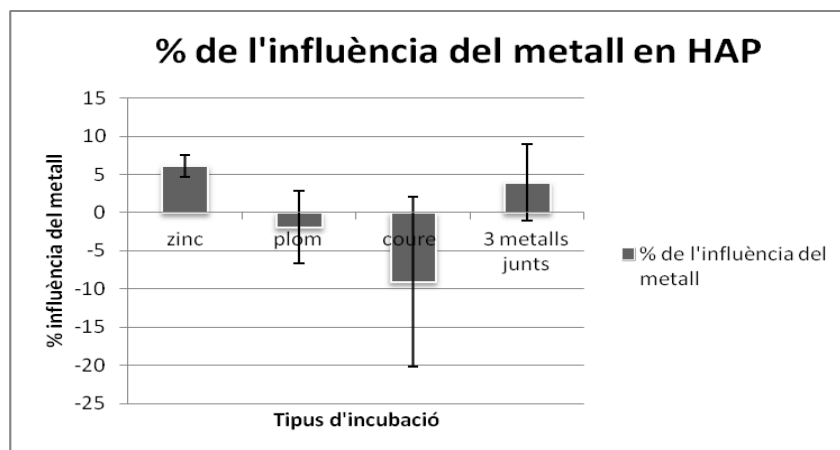


**Figura 3:** % de l'influència del metall sobre la cristal·lització en COM

En canvi, si observem els resultats amb els metalls junts s'aprecia clarament un efecte sinèrgic en la formació de cristalls; en altres paraules, la presència dels tres metalls afavoreix la cristal·lització del calci.

### Incubacions orines artificials amb hidroxiapatita:

Pel que fa al percentatge de pèrdua dels metalls en hidroxiapatita, s'han obtingut resultats molt diferents als d'oxalat càlcic. Resulta especialment interessant el fet que per tots els metalls s'ha determinat una pèrdua del 100 %, fet que suggereix que la HAP es capaç d'absorbir tots els metalls en solució, dintre dels rangs de concentració estudiats.



**Figura 4:** % de l'influència del metall sobre la cristal·lització en HAP

D'altra banda, analitzant el percentatge de influència del metall, figura 4 (equació 1.), obtenim uns resultats molt interessants. S'observa clarament que el zinc té una influència com a metall positiva sobre cristal·lització, és a dir, afavoreix la formació de cristalls mentre que el plom no afecta de manera clara a la precipitació. El coure ha donat uns resultats diferents ja que té una influència oposada sobre aquest paràmetre. Això significa que el coure actua com a inhibidor de la precipitació de HAP. Aquest fet sembla molt remarcable; tanmateix, cal dir que els resultats de coure presenten una desviació estàndard molt gran i no podríem justificar completament aquest fet. Per obtenir una resposta definitiva caldria aprofundir aquesta part de l'estudi.

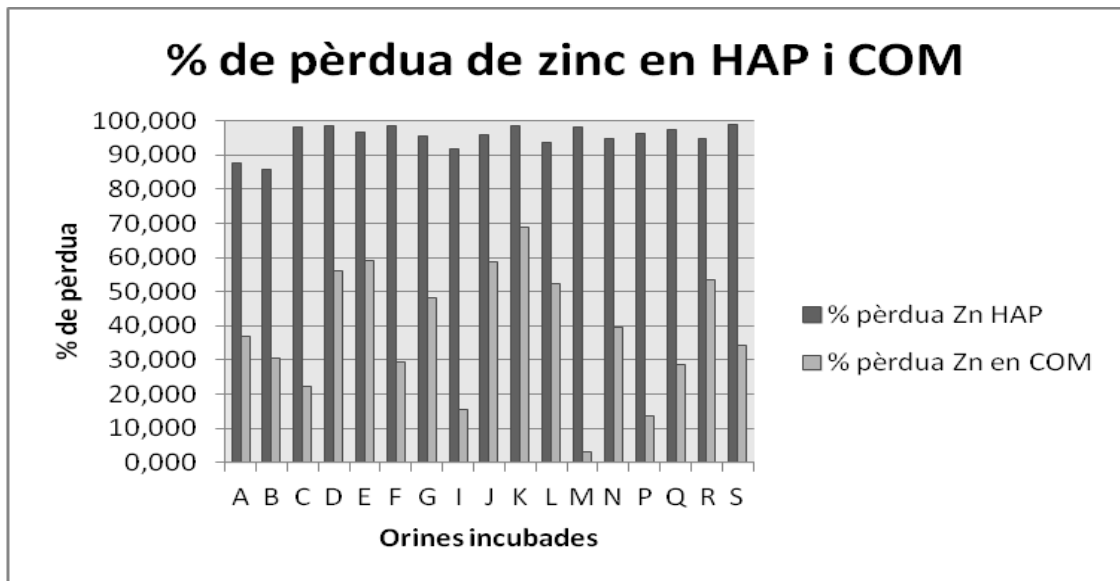
D'altra banda, quan els tres elements es troben junts, actuen com a promotors de la cristal·lització de HAP.

En conclusió, s'ha observat una clara diferència en les incubacions amb oxalat de calci i hidroxiapatita. Mentre que el zinc afavoreix la formació de cristalls en els dos casos, el plom i coure tenen un efecte diferent en cada cas.

En les incubacions de COM s'ha observat que la presència dels tres metalls afavoreix clarament la cristal·lització. D'altra banda, a les incubacions de HAP la influència dels tres metalls té un efecte promotor de la precipitació més discret.

### Incubacions d'orines reals:

Amb les orines obtingudes dels controls s'han fet 19 incubacions, de les quals s'han descartat dues perquè es van obtenir resultats anòmals. Es va calcular el % de pèrdua de zinc en hidroxiapatita i oxalat de calci (equació 5) per observar el comportament del zinc en presència d'una orina sobresaturada i amb una llavor. També es va observar el % de la influència del zinc en les dues situacions, per tal de determinar si aquest zinc afegit influeix en la cristal·lització de calci (equació 4). Pel que fa al % de pèrdua del zinc s'han obtingut els següents resultats:

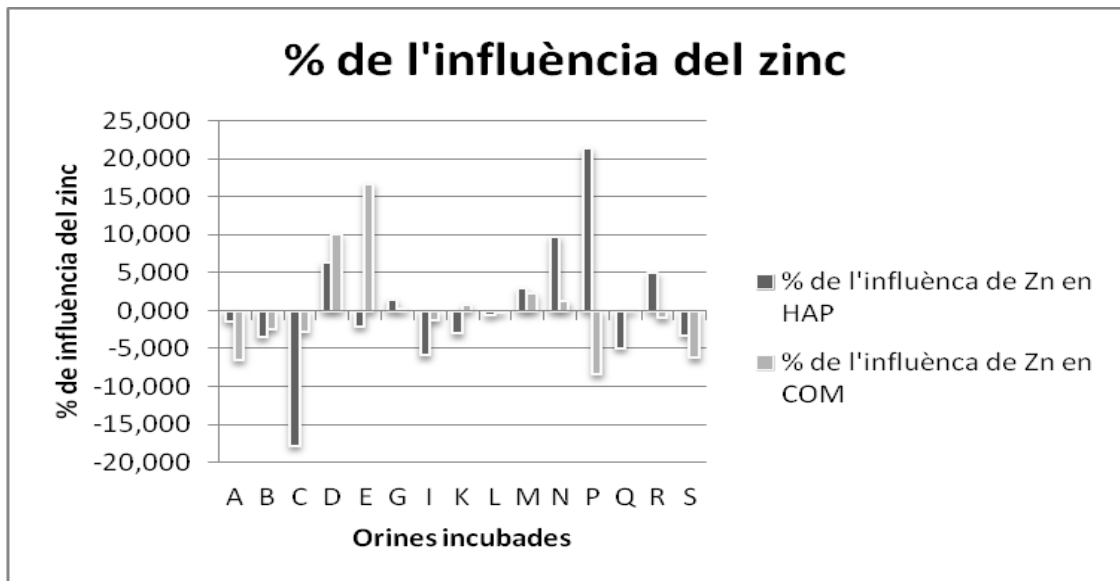


**Figura 5:** % de pèrdua de zinc en hidroxiapatita i oxalat de calci. Cada parella de columnes representa una mostra.

Analitzant la figura 5 s'observa una clara semblança dels resultats amb les orines artificials: el zinc quasi té un 100% de pèrdua en la hidroxiapatita. Per tant, quan és té una càlcul de HAP, aquest és capaç d'absorbir pràcticament tot el zinc en dissolució. D'altra banda, els valors pel zinc en oxalat de calci tenen una dispersió molt més acusada. Tot i així, la mitja de tots els resultats correspon a un 38% de pèrdua, valor similar al de les incubacions artificials.

Es pot concloure, per tant, que el COM no té la mateixa capacitat d'absorbir el zinc que la HAP. A més, amb les orines artificials s'ha pogut obtenir un resultat similar al de les orines reals.

Cal comparar si aquesta absorció de zinc als dos tipus de càlculs afavoreix la cristal·lització de calci, el que implicaria un augment del risc litiàsic. Els resultats es mostren a la Figura 6. En aquest cas, també dues mostres van ser descartades, en donar resultats anòmals.

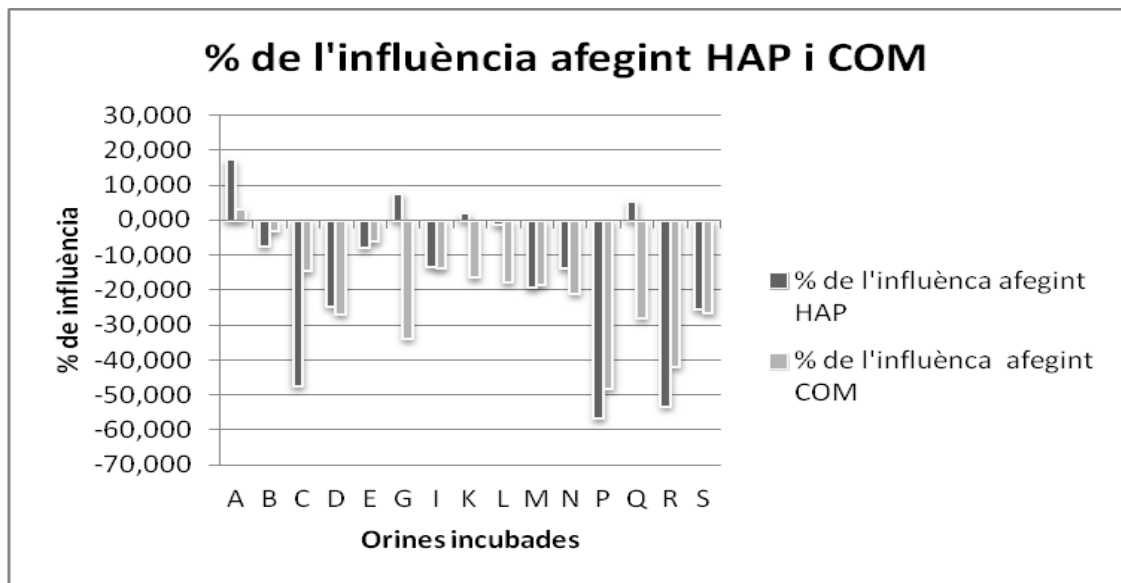


**Figura 6:** % de l'influència del zinc a l'oxalat de calci i hidroxiapatita.

En aquesta figura es pot veure, per a cada incubació i cada tipus d'orina, el seu % d'inhibició afegint zinc. Observant la figura 6, no s'observa cap relació entre els resultats. Hi ha incubacions que donen una influència positiva i, per tant, s'ha dissolt una part de llavor afegida. També es troben una influència del zinc negativa, és a dir, orines a les que una part del calci ha cristal·litzat sobre la llavor. S'ha intentat buscar una relació entre el resultats comparant els percentatges d'inhibició amb la concentració de calci, la concentració total de zinc i el seu pH, però en cap d'aquestes comparacions s'ha pogut trobar una relació clara.

Per tant, no podem confirmar que el zinc influeix sobre la cristal·lització en les mostres reals. Aquests resultats són totalment diferents que les incubacions artificials, ja que s'observava que el zinc facilitava la formació de cristalls. La justificació d'aquest comportament es pot basar en el fet que l'orina és una matriu molt més complexa i conté tota una sèrie d'agents inhibidors com el citrat, els glicosaminoglicans i diverses proteïnes, que poden disminuir l'efecte del zinc.

D'altra banda, també s'han analitzat les dades del % de la influència natural amb COM i HAP sense haver afegit zinc, això és la cristal·lització natural del calci a les orines que s'ha analitzat (equació 6.). Els resultats se expressen en la figura 7.



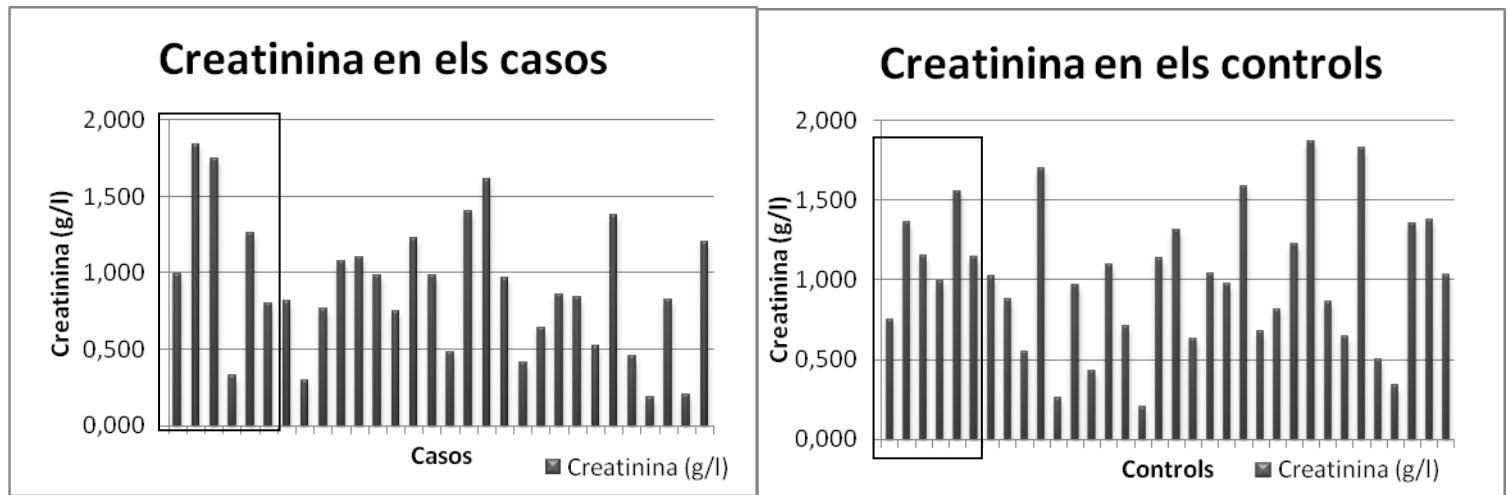
**Figura 7:** % de l'influència natural amb l'oxalat de calci i hidroxiapatita sense afegir zinc

Aquí s'observa que en la majoria de casos, tant per les incubacions amb HAP com per les incubacions amb COM, hi ha percentatge d'influència negativa i, per tant, els calci ha precipitat. Això és un resultat esperat ja que l'orina es troba sobresaturada i tendeix a produir precipitats si es modifica l'activitat hidrodinàmica natural del cos. Si a més es troba en presència de llavors o nuclis de precipitació la cristal·lització es fa encara més important.

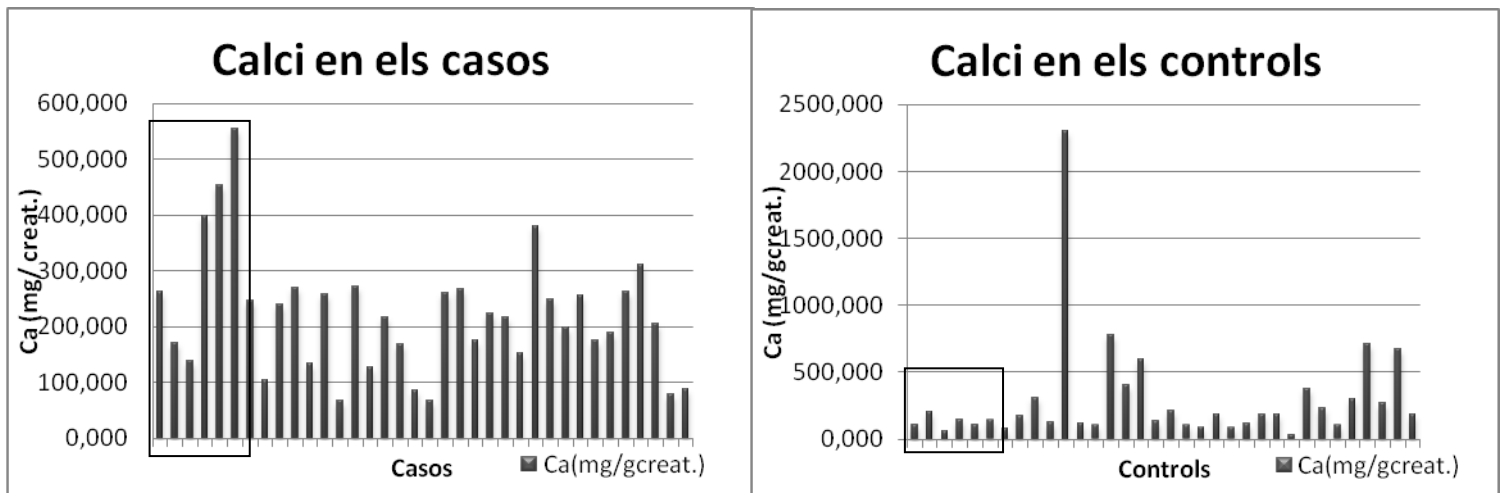
### **3.2. Explicació dels resultats de l'estudi de Flix**

En el present estudi es volia determinar, mitjançant l'orina, si a la zona de Flix les persones contenen concentracions més altes de metalls pesants que a la zona de control. En total es van aconseguir 35 controls i des de Flix van arribar 37 casos. Com s'ha explicat a la metodologia, s'ha determinat la concentració dels tres metalls pesants i del calci a les mostres i la creatinina per normalitzar els resultats.

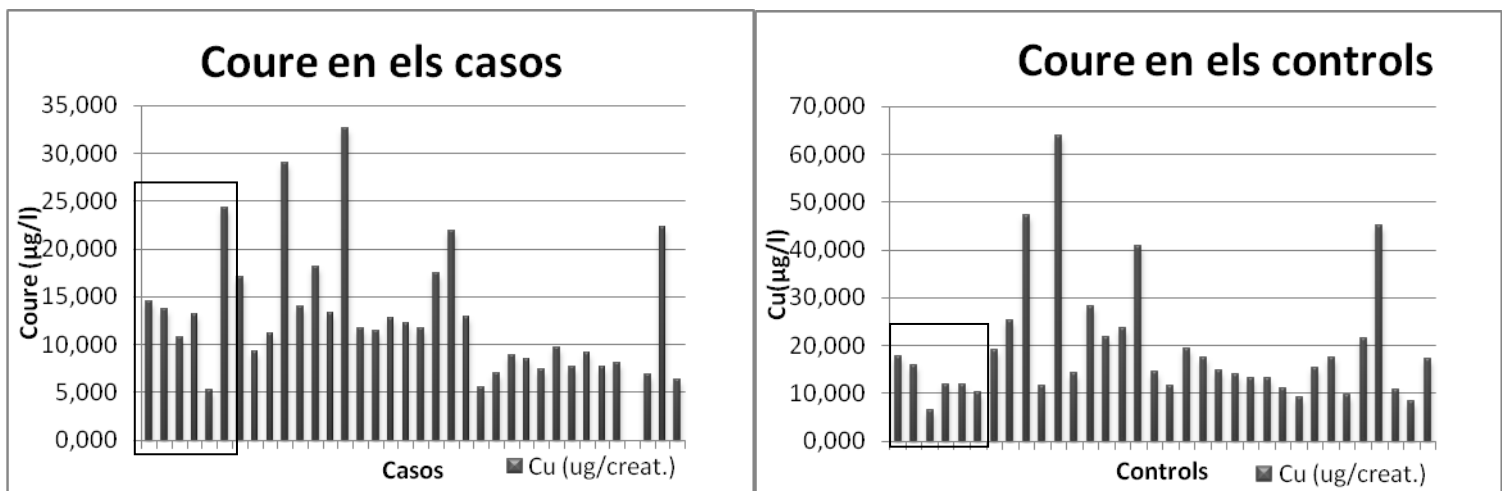
Es demostrarà per cada zona i per cada mostra les concentracions de creatinina, calci, coure, zinc i plom, i després les dades obtingudes es resumeixen a les taules 7 i 8. Les columnes que es troben buits es perquè estan sota el nivell de detecció.



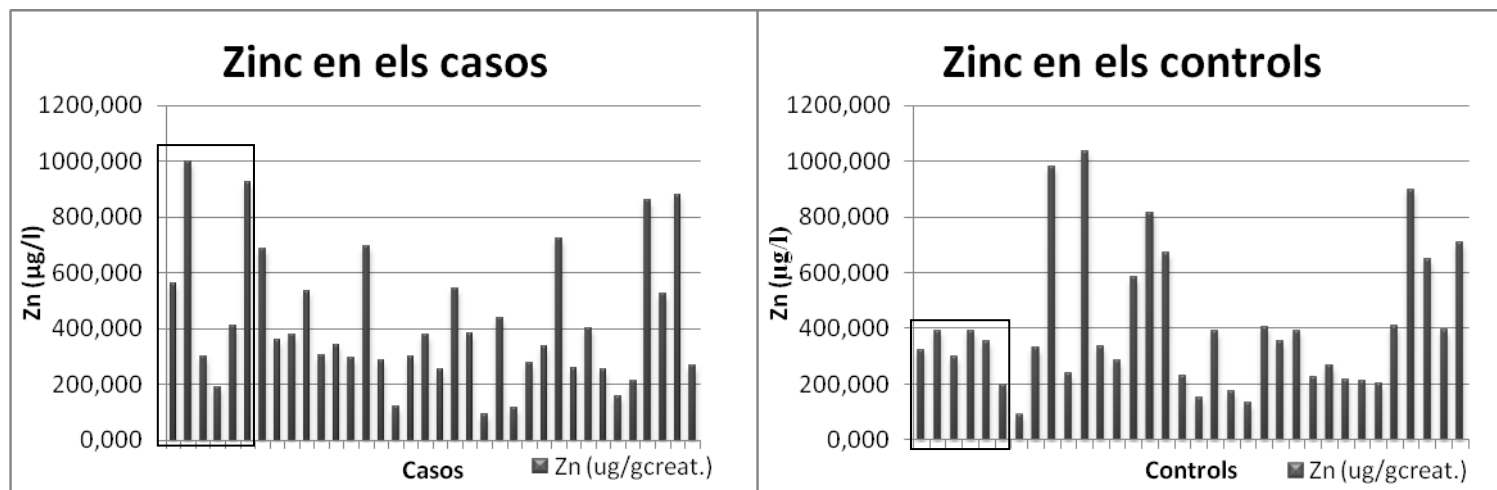
**Figura 8:** Concentració de creatinina en totes les mostres analitzades. En el recuadre es mostren els resultats de voluntaris que han patit episodi litíasi.



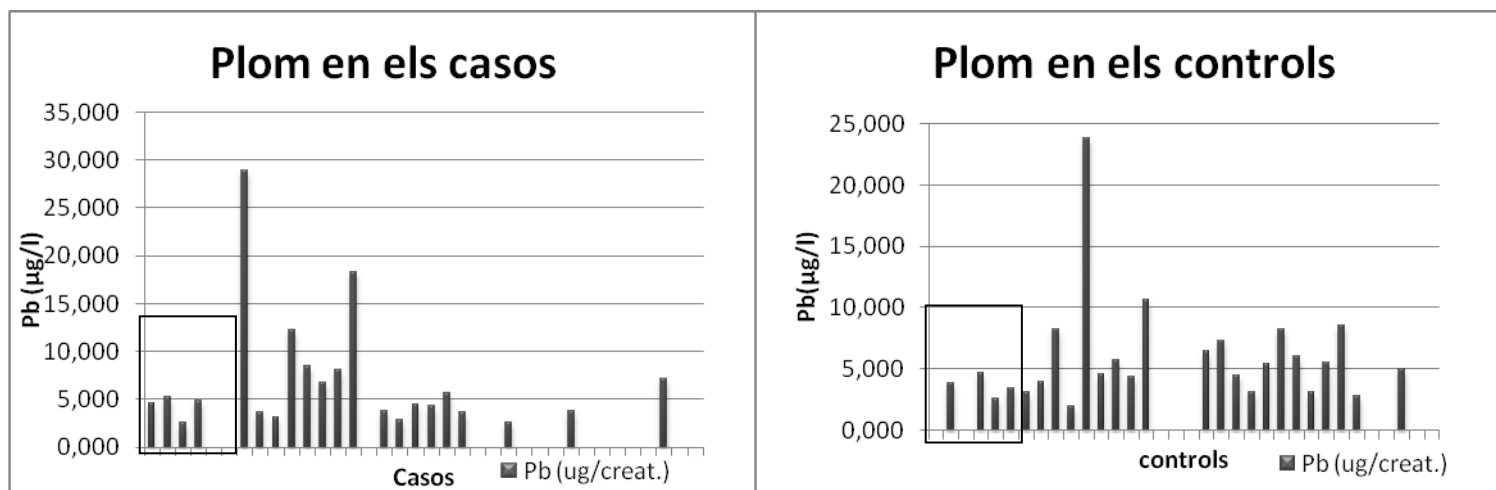
**Figura 9:** Concentració de calci en totes les mostres analitzades. En el recuadre es mostren els resultats de voluntaris que han patit episodi litíasi.



**Figura 10:** Concentració de coure en totes les mostres analitzades. En el recuadre es mostren els resultats de voluntaris que han patit episodi litíasi.



**Figura 11:** Concentració de zinc en totes les mostres analitzades. En el recuadre es mostren els resultats de voluntaris que han patit episodi litiàsic.



**Figura 12:** Concentració de plom en totes les mostres analitzades. En el recuadre es mostren els resultats de voluntaris que han patit episodi litiàsic.

Com es pot observar hi ha una gran diferència en cada mostra, aquí es posa el resum de totes les dades:

**Taula 1 :** determinació de la concentració de creatinina, calci, coure, zinc i plom dels casos

Casos (n=37)	Creatinina (g/l)	Ca(mg/g creat.)	Cu (ug/g creat.)	Zn (ug/g creat.)	Pb (ug/g creat.)
Mitja	0,919	220	12,9	418	6,897
Desviació estàndard	0,420	107	6,51	238	6,248
Interval	(0,188-1,837)	(67-556)	(0-32,6)	(90,5-998)	(0-28,9)

**Taula 2:** determinació de la concentració de creatinina, calci, coure, zinc i plom als voluntaris de Flix.

Controls (n=35)	Creatinina (g/l)	Ca(mg/g creat.)	Cu (ug/g creat.)	Zn (ug/g creat.)	Pb (ug/g creat.)
Mitja	0,999	292	19,2	404	5,852
Desviació estàndard	0,433	403	12,6	246	4,320
Interval	(0,199-1,869)	(34,1-2299)	(6,37-63,9)	(89,6-1037)	(0-23,8)

S'han pogut quantificar els tres metalls pesants en les dues zones però no hi ha diferències significatives entre aquestes. Per tant, encara que s'hagin trobat altes concentracions de metalls als fangs de l'embassament, aparentment no influeixen en l'entrada d'aquests elements al nostre cos, si més no, pels metalls analitzats: Cu, Zn i Pb. Pot ser si es analitza mercuri o cadmi, metalls pesants que s'han trobat també als fangs de l'embassament, podríem trobar diferències

L'entrada d'aquest metalls no serà per inhalació sinó la majoria per la ingesta d'aquest compostos, ja que es troben en quasi tots els aliments. Aquests resultats fan descartar la hipòtesi inicial de l'estudi, que plantejava una concentració de metalls pesants en orina superior a la zona de Flix que a la zona control. La població estudiada de Flix té la mateixa exposició de metalls que els controls, excepte el coure que té una concentració estadísticament major en els controls que els casos.

Hi ha diferents explicacions a aquest fet. És possible que realment no hi tenen cap exposició, però també podria ser que la majoria de aliments que consumeixen les persones de Flix provenen fora de l'àrea de Flix i que siguin els mateixos aliments que consumim a l'àrea de Barcelona.

També podem confirmar que realment la població està exposada a aquests metalls, especialment al zinc. Pel que fa a les concentracions de coure i de zinc, els nivells detectats no són alarmants, ja que tots dos són micronutrients necessaris. D'altra banda, la majoria conté quantitats detectables de plom, encara que són molt baixes.

Segons els metalls analitzats a les orines dels casos i controls, no podem confirmar que al contenir aquests metalls tenen més risc de patir càlculs renals. Observant només els resultats obtinguts a les orines artificials podríem dir que totes les orines



analitzades tenen un cert increment del risc litiàsic amb l'oxalat de calci al tenir concentracions altes de zinc. S'ha vist que en aquelles situacions el zinc actua com a promotor de la cristal·lització. Tot i així, s'ha observat a les incubacions reals que no podem confirmar aquest fet, ja que l'orina conté moltes altres molècules que poden reduir l'efecte del zinc i també el risc litiàsic. Per tant, tant els casos com els controls, tenen la mateixa probabilitat de patir càlculs litiàsics. Aquesta probabilitat està fortament influïda per la resta de paràmetres urinaris dependents de cada individu.

D'altra banda, s'han agrupat les dades dels voluntaris que han patit episodis de càlculs renals al llarg de la seva vida, per observar si les concentracions de metalls són diferents en cada àrea. En les sis primeres columnes de les figures 8, 9, 10, 11 i 12, es troben les concentracions dels elements analitzats dels voluntaris que han patits episodis. Els resultats s'expressen a les taules 9 i 10.

**Taula 3:** Determinació de la concentració de creatinina, calci, coure, zinc i plom als voluntaris que contenen càlculs renals l'àrea dels casos

<b>Casos (n=6)</b>	<b>Creatinina (g/l)</b>	<b>Ca (mg/gcreat.)</b>	<b>Cu (ug/creat.)</b>	<b>Zn (ug/gcreat.)</b>	<b>Pb (ug/creat.)</b>
<b>Mitja</b>	<b>1,024</b>	<b>329,713</b>	<b>10,550</b>	<b>565,164</b>	<b>2,882</b>
<b>Desviació estàndard</b>	<b>0,314</b>	<b>165,985</b>	<b>9,354</b>	<b>332,332</b>	<b>2,413</b>
<b>Interval</b>	(0,587-1,368)	(139,379-555,810)	(0-24,300)	(191,283-998,414)	(0-5,241)

**Taula 4:** Determinació de la concentració de creatinina, calci, coure, zinc i plom als voluntaris que contenen càlculs renals l'àrea dels controls

<b>Controls (n=6)</b>	<b>Creatinina (g/l)</b>	<b>Ca (mg/gcreat.)</b>	<b>Cu (ug/creat.)</b>	<b>Zn (ug/gcreat.)</b>	<b>Pb (ug/creat.)</b>
<b>Mitja</b>	<b>1,159</b>	<b>127,909</b>	<b>12,301</b>	<b>325,135</b>	<b>2,394</b>
<b>Desviació estàndard</b>	<b>0,280</b>	<b>46,639</b>	<b>4,029</b>	<b>72,745</b>	<b>1,977</b>
<b>Interval</b>	(0,752-1,554)	(63,343-200,901)	(6,366-17,705)	(197,062-391,301)	(0-4,633)

En aquestes taules tampoc veiem diferències significatives entre les dues zones. A primera vista es veu una diferència gradual del zinc en els dos casos però estadísticament no són significatius ( $P=0,14$ ). Hi ha només una diferència significativa ( $P<0,05$ ) amb els voluntaris de Flix que han patit càlculs renals, ja que tenen major concentració de calci que els controls. Això no està directament relacionat amb l'exposició a metalls pesants.

---

Per concloure, s'ha determinat la concentració dels tres metalls per comparar dues zones, l'àrea de Barcelona i l'àrea de Flix. S'ha comprovat que la hipòtesi inicial (l'àrea de Flix està més exposada als metalls analitzats) no és certa, ja que s'han trobat aproximadament les mateixes concentracions.

### **4. Conclusions:**

En aquest estudi s'han pogut analitzar diferents aspectes de la litiasi renal, i també s'ha pogut fer una relació entre dues zones de Catalunya per observar la exposició d'aquest metalls sobre la salut humana.

En les incubacions s'han obtingut diferents resultats :

- S'ha observat la pèrdua de metalls en totes les incubacions realitzades, amb lleugeres diferències:
  - Al cas de l'oxalat de calci, els metalls analitzats precipiten tan individualment com quan es troben conjuntament en solució, tot i que el percentatge de pèrdua del Zn és molt més alt quan es troba individualment.
  - Per la hidroxiapatita, s'ha vist que tots els metalls precipiten totalment dintre del rang de concentracions estudiat, diferència clara amb l'oxalat de calci. Per tant el COM no té la mateixa capacitat d'absorbir els metalls que la HAP.
- L'efecte inhibidor o promotor de la precipitació de sals de calci que tenen els metalls és diferent al cas de l'oxalat de calci i de la hidroxiapatita:
  - Els metalls han demostrat tenir un efecte promotor de la precipitació de COM. El fet més destacable és que aquest efecte és sinèrgic quan els tres metalls en estudi es troben junts en solució.
  - Al cas de la hidroxiapatita, la influència dels tres metalls té un efecte dels metalls sobre la precipitació més discret.
- Les incubacions amb orines reals han donat uns resultats similars a les incubacions amb orina artificial pel que fa el percentatge de pèrdua del zinc, ja que el zinc queda absorbit aproximadament amb els mateixos percentatges tant pel COM que pel HAP:
  - Cal destacar que els resultats obtinguts pel Zn amb orines artificials no s'han reproduït de la mateixa manera S'ha vist que pot actuar tant com un promotor o un inhibidor de la cristal·lització del calci. Això es causa de que l'orina es una matriu molt més complexa que les orines

---

artificials, ja que conté tota una sèrie d'agents inhibidors que poden disminuir l'efecte del zinc.

- De l'estudi de Flix s'ha relacionat una zona contaminada com la de Flix amb altre, suposadament, menys contaminant. se n'extreuen les afirmacions següents:
  - Les concentracions dels metalls en estudi no difereixen significativament dels valors trobats per la població control.
  - Agrupant les dades de voluntaris que han patit algun episodi litiàsic, només es detecta que la concentració de calci és superior per aquests que per al grup control, un resultat independent de la concentració de metalls pesants.

**5. Bibliografia:**

1. B.J. Alloway "Heavy metals in soils" Second edition. Ed. Blackie academic & professional.
2. R.B. Ahumada " Nivel de concentración E índice de bioacumulación para metales pesados (Cd, Cr, Hg, Ni, Cu, Pb i Zinc) e tejidos de invertebrados bénticos de Bahía San Vicente, Chile." Rev. Biol. Mar., Valparaíso, 29 (1): 77-87, octubre de 1994.
3. L.K. Wang, J.P. Chen, Y. Hung, N.K. Shammass " Heavy metals in the environment" Ed. CRC Press, Taylor & Francis Gropu
4. H. Choudhury, T. Stedeford, J. Donohue, L. Ingerman, M. Osier, M. Fransen, A.R. MacDonald "Toxicological review of zinc and compounds (CAS No. 7440-66-6)" In Support of Summary Information on the Integrated Risk Information System (IRIS).July 2005. U.S. Environmental Protection Agency Washington D.C
5. N. Roney, Cassandra V. Smith, M. Williams, M. Osier, S. J. Paikoff, "Toxicological profile for zinc" U.S. Department of health and human services. Public Health Service. Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
6. Jones R, Burgess MSE. 1984. Zinc and cadmium in soils and plants near electrical transmission (hydro) towers. Environ Sci Technol 18(10):731-734.
7. H. Abadin, A. Ashizawa, Y.W. Stevens, F. Lladós, G. Diamond, G. Sage, M. Citra, A. Quinones, S. J. Bosch, S. G. Swarts, , "Toxicological profile for lead" U.S. Department of health and human services. Public Health Service. Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
8. Dorsey, L. Ingerman, S. Swarts, "Toxicological profile for copper". U.S. Department of health and human services. Public Health Service. Agency for Toxic Substances and Disease Registry .
9. Agència Catalana de l'Aigua "Programa d'actuacions per a la gestió dels fangs residuals generats en els processos de depuració d'aigües residuals urbanes de Catalunya" Juny 2010. Generalitat de Catalunya, Departament de Medi Ambient i Habitatge.
10. E. Alonso Álvarez, M. Callejón Mochón , J.C. Jiménez Sánchez, M. Ternero Rodríguez "Heavy metal extractable forms in sludge from wastewater treatment plants" Chemosphere 47 (2002) 765–775
11. C. Wang, X. Hu, M.L. Chen, Y.H. Wu "Total concentrations and fractions of Cd, Cr, Pb, Cu, Ni and Zn in sewage sludge from municipal and industrial wastewater treatment plants" Journal of Hazardous Materials B119 (2005) 245–249. Elsevier.
12. REAL DECRETO 1310/1990. de 29 de octubre, por el que se regula la utilización de los lodos de depuración en el sector agrario.
13. P. S. Hooda, D. McNulty , B. J. Alloway , M. N. Aitken "Plant Availability of Heavy Metals in Soils Previously Amended with Heavy Applications of Sewage Sludge"
14. N. Kumar J.I., H. Soni, R. N. Kumar, I. Bhatt "Hyperaccumulation and mobility of heavy metals in vegetable crops in India" The Journal of Agriculture and Environment Vol:10, Jun.2009.

15. Methfessel AH, Spencer H. 1973. "Zinc metabolism in the rat: I. Intestinal absorption of zinc". J Appl Physiol 34:58-62.
16. "Lead and Lead Compounds, CAS No. 7439-92-1 (Lead)" Report on Carcinogens, Twelfth Edition (2011). National Toxicology Program, Department of Health and Human Services
17. N. Ferré i Huguet "Nivells de metalls pesants a la conca catalana del riu ebre. Avaluació del risc per a la població i l'ecosistema" Universitat Rovira i Virgili, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Laboratori de Toxicologia i Salut Mediambiental. Reus, 2007
18. C. Barbas, A. García, L. Saavedra, M. Muros " Urinary analysis of nephrolithiasis markers" Journal of Chromatography B, 781 (2002) 433-455. Elsevier Science B.V.
19. J.A. Muñoz Martínez "Litiasis renal oxalocálcica. Avances en la comprensión de su etiología i mejoras en la metodología analítica para su estudio" Centre de Grup de Tècniques de Separació Química, Universitat Autònoma de Barcelona. 2004.
20. C. Barbas, A. García, L. Saavedra, M. Muros " Urinary analysis of nephrolithiasis markers" Journal of Chromatography B, 781 (2002) 433-455. Elsevier Science B.V.
21. Zarasvandi, A., et al., "Major and trace element composition of urinary stones, Khuzestan province, southwest, Iran", Journal of Geochemical Exploration (2012)
22. V. Romero, H. Akpinar, D. G. Assimos "Kidney Stones: A Global Picture of Prevalence, Incidence, and Associated Risk Factors" Disease state review. VOL. 12 NO. 2/3 2010 Reviews in Urology.
23. D. Bazin, P. Chevallier, G. Matzen, P. Junger, M. Daudon "Heavy elements in urinary stones" Urol Res (2007) 35: 179-184, Springer.
24. [www.enciclopèdia.cat](http://www.enciclopèdia.cat) (darrera visita 04/01/2013)
25. [www.idescat.cat](http://www.idescat.cat) (darrera visita 04/01/2013)
26. <http://www20.gencat.cat/portal/site/meteocat/> (darrera visita 05/01/2013)
27. V. Casadó Burillo, M. Anguera Terré "Les serres del pas de l'ase. Una frontera fitogeogràfica" Miscel·lània 13. CERE. 1999, p 21-48.
28. E. Costa Garangou "Processos de sedimentació i distribució de radioactivitat natural i artificial en sistemes aquàtics continentals de Catalunya (embassament de Flix i tram català del riu Ebre, Camarasa i Llac Pirinencs" Tesis doctoral 2004, Facultat de Ciències, Departament de Física-Institut de Ciència i Tecnologia Ambiental (ICTA).
29. [www.creaf.cat](http://www.creaf.cat) (Darrera visita 07/01/2013)
30. P. Muñoz Hernández, M. Hierro Castarlenas, P. Muñoz Hernández, J. A. Collazos Ribera, A. Gisbert Torné, F. J. de Madariaga Fernández, J. Sánchez Cervelló, J.M. Armora Casadó, J. Torres Messeguer, J.L. Peña Peñacoba " Centenari de "La Fàbrica" de la sociedad electro-química de Flix a Erkimia 1898-1997". Erkimia, Grupo Ercros. 1997.
31. "Sessió informativa de la comissió de política territorial amb el conceller de medi ambient i habitatge per presentar l'informe sobre els contaminants en els sistemes aquàtics continentals, especialment pel que fa al riu ebre al pas per

- flix (ribera d'ebre)". Número de tramitació 355-00050/07. Parlament de Catalunya, 20 d'octubre de 2004.
32. <http://www.idiapigol.org/> (Visitat el 10/11/2012)
  33. S. King Strasinger, M. Schaub Di Lorenzo "Urinalysis and Body Fluids" fifth edition. E.A. Davis Company. Philadelphia 2008.
  34. F. Grases, O. Söhnle, A. Costa-Bauzá, M. Ramis, Z. Wang (2001) "Study on concretions developed around urinary catheters and mechanisms of renal calculi development." Nephron 88: 320
  35. J.A. Wesson, V. Ganne, A. M. Beshensky, J.G. Kleinman "Regulation by macromolecules of calcium oxalate crystal aggregation in stone formers" Urol Res (2005) 33: 206-212)
  36. H. Fleisch "Inhibitors and promoters of Stone formation." Kidney Int 13, 1978, 361.
  37. C. Minoia, E. Sabbioni, P. Apostolo, R. Pietra, L. Pozzoli, M. Gallorini, G. Nicolaou, L. Alessio, E. Capodaglio " Trace element reference values in tissues from inhabitants of the european community I. A study of 46 elements in urine, blood and serum of italian subjects"
  38. D. A. Skoog, F.J. Holler, T.A. Nieman "Principios de Análisis instrumental" Quinta edición. Mc Graw Hill.
  39. R.Thomson "Practical guide to ICP-MS: a tutorial for beginners" Second edition. CRC Press. 2008.
  40. J.A. Muñoz Martínez "Litiasis renal oxalocálcica. Avances en la comprensión de su etiología i mejoras en la metodología analítica para su estudio" Centre de Grup de Tècniques de Separació Química, Universitat Autònoma de Barcelona. 2004.
  41. R. Boqué "La selectivitat en anàlisi química" Grup de Quimiometria, Qualimetria i Nanosensors Universitat Rovira i Virgili (Tarragona)
  42. N.A. Díaz, J.A. Bárcena Ruiz, E.F. Reyes, A.G. Cejuda, J.J. Novo, J. Peinado Peinado, F. Toribio Meléndez-Valdés, I. Túnez Fiñana "8. Espectrofotometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas. "
  43. M. McClean, J. J. Amador, R. Laws, J. S. Kaufman, D. E. Weiner, J. M. Sánchez Rodríguez, O. Ramírez Rubio, D. Brooks "Informe de muestreo biológico: Marcadores biológicos de daño renal e insuficiencia renal crónica en trabajadores del Occidente de Nicaragua" Escuela de Salud Pública de la Universidad de Boston 715 Albany St - Boston, MA 021
  44. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo "Determinación de creatinina en orina—método de detección ultravioleta en modo isocrática/cromatografía líquida de alta resolución" MTA / MB – 027/A08. Ministerio de trabajo e inmigración.
  45. Greenwald "The chemistry of jaffe's reaction for creatinine. VI. A compound of picric acid with two molecules of creatinine. Its combinations with acid and alkali." January 21, 1930. Littaur Pneumonia Research Fund, New York University, New York.
  46. H. Hudson, A. Rapoport "Estimation of Creatinine by the Jaffe reaction. A comparison of three methods" Vol. 14, No. 3, 1968, Clinical Chemistry

## **6. Annexos:**

**6.1. Formularis i protocols: Formulari de primera comunicació, Certificat del comitè ètic, Protocol per als facultatius i Informació pels pacients**



## Formulari de Primera Comunicació

Data: 27 de novembre del 2012

Títol descriptiu del projecte/ consulta: (\* Imprescindible)

Influència de la presència de metalls pesants en el risc litiàsic.

Dades de la persona de contacte: (\* Imprescindible)

Nom i cognoms	<b>Montserrat López Mesas</b>
E-mail	<b>Montserrat.lopez.mesas@uab.cat</b>
Telèfon de contacte	<b>93 581 49 38</b>
Centre de treball	<b>Universitat Autònoma de Barcelona (UAB)</b>
Càrrec	<b>Investigadora</b>

## Autors/Inventors/Participants

Nom i cognoms	Relació laboral	Entitat	% participació
<b>Jeroen de Bont</b>	Col·laborador	UAB	100
<b>Francisco Blanco</b>	Becari estudiant doctorat	UAB	50

1. Àrea sanitària on incideix la solució aportada.

Centre d'Atenció Primària de Flix

2. Situació actual a solucionar o necessitat existent.

Aproximadament un 12% de la població pateix algun episodi de càlculs renals i en un 10% en 1 any, 33% en 5 anys i un 50% en 10 anys poden patir recidiva sent a més un procés dolorós pel portador i disminuint la seva qualitat de vida. És molt important controlar els paràmetres que poden incidir en el creixement per tal de reduir la formació dels mateixos. Aquesta formació es pot veure afectada, ja sigui de forma positiva o negativa, per diversos factors com la presència d'altres substàncies com ara metalls pesants.

3. Solucions actuals que es donen al problema o necessitat detectada.

Actualment als pacients portadors de càlculs renals se'ls indica la ingesta de grans quantitats d'aigua com a mètode preventiu del creixement cristal·lí. Aquesta és una solució que el pacient no continua fent durant llarg temps i que resulta poc específica per tractar diferents tipus de litiasi renal. El nostre grup de recerca es planteja trobar

solucions més efectives per dur a terme aquests tractament, com ara la ingesta de compostos inhibidors del creixement dels càlculs.

4. Proposta de solució o resultat esperat de la mateixa (invenció desenvolupada).  
¿Quins avantatges aporta?

Es vol estudiar com afecta la presència de metalls pesants en el creixement de càlculs renals i en quina quantitat es poden trobar aquests metalls en la orina de poblacions amb possibilitat d'exposició als mateixos.  
L'establiment d'una relació entre aquests metalls i el desenvolupament dels càlculs renals pot permetre definir tractaments concrets que puguin solucionar aquesta vessant de la litiasi, tot millorant la qualitat de vida del pacient.

5. Tipus de solució

Software		Procés assistencial	
Algoritmes matemàtics		Guia clínica	
Bases de dades		Dispositiu mèdic	
Contingut audiovisual		Test per Diagnòstic In Vitro	
TIC		Medicament	X
Qüestionari		Formació	
Altres: Aprofundir el coneixement científic actual en el procés de formació de càlculs renals per tal de disminuir la seva velocitat de formació i avaluar la necessitat d'establir tractaments específics per a un possible tractament.			

6. Estat actual de la solució proposta i següents passos previstos.

Actualment, s'estan realitzant incubacions *in vitro* per determinar la influència dels metalls pesats sobre el creixement cristal·lí, tant sobre mostres sintètiques com sobre orines reals. S'avalua el creixement d'una llavor d'oxalat de calci i la localització dels metalls abans i després del procediment. Aquests estudis han de ser complementats amb anàlisis de metalls en orines humanes de poblacions exposades als mateixos. Amb els resultats d'ambdós estudis s'avaluarà com afecta la quantitat de metall que es troba en orina al creixement i s'avaluarà una possible via d'atac al creixement cristal·lí.

7. Per a què es demana assessorament per part d'innovació?

Desenvolupament de la idea		Prestació de serveis	
Transferència		Creació d'empresa	
Col·laboració per a investigació	X	Col·laboració per a desenvolupament	
Altres:			

8. Existeix algun antecedent a la solució aportada (invenció, patent, etc.)?

Al nostre grup d'investigació hem treballat durant els últims 10 anys en la litiasi renal tant en el desenvolupament de processos de reconeixement de càlculs com ara els processos de formació dels mateixos. En aquest sentit el grup de recerca ha publicat diverses patents al camp de la litiasi renal, incloent una enfocada a l'avaluació del risc litogen. Per tal de complementar la bibliografia consultada i per continuar els estudis

previs realitzats en aquest camp al nostre grup, considerem oportú realitzar aquests experiments amb orina d'una població exposada a metalls pesats.

9. Àmbits d'aplicació de la solució. Es pot aplicar en altres àmbits?

Sí. La formació de càlculs renals (fonamentalment aquells basats en sals càlciques) és un procés relacionat amb altres desordres d'origen mineral, com ara la formació de càlculs formats a la cavitat bucal (tàrtar) o l'osteoporosi. D'aquesta forma, els resultats podrien tenir influència en altres especialitats mèdiques.

10. S'ha rebut algun tipus de finançament o material per al desenvolupament de la solució? Existeixen col·laboracions amb tercers?

En altres estudis relacionats s'han dut a terme col·laboracions amb centres hospitalaris de l'àrea de Barcelona, que queden exclosos tenint en compte el plantejament d'aquest estudi.

11. Hi ha alguna empresa interessada en la solució?

No

12. S'ha fet o es pretén fer algun tipus de divulgació de la solució aportada?

Els resultats obtinguts durant aquest estudi seran elaborats per tal de publicar-los a la revista científica més adient, a més de presentar-los públicament a congressos que puguin resultar d'interès. En cas que sigui factible, es realitzarà la transferència de coneixement més adient.

13. Comentaris a afegir

Per tal de completar l'estudi que estem desenvolupant a nivell de laboratori, necessitem la col·laboració de centres assistencials els quals coneixen el protocol per a una bona recollida d'orina i tenen accés a població possiblement exposada. Nosaltres, com a centre de recerca, no disposem d'aquesta facilitat i per tant ens posem en contacte amb centres mèdics. Actualment, col·laborem amb diferents serveis d'urologia de diversos hospitals de l'àrea de Barcelona (p.ex. Bellvitge, Germans Trias o Dexeus) que ens proporcionen càlculs renals, amb els que desenvolupem altres estudis. Atès el plantejament d'aquest estudi (interacció dels metalls pesants a la litiasi urinària) volem adaptar l'àrea de mostreig a una en la qual pugui trobar-se una població que hagi estat exposada a metalls pesants. Desafortunadament l'àrea de Flix és coneguda per la seva contaminació en aquests elements cosa que ens ha portat a contactar amb el Centre d'Atenció Primària de Flix.

ENVIAR AQUEST QÜESTIONARI UN COP COMPLETAT A:

[cibanez@idiapjgol.org](mailto:cibanez@idiapjgol.org)

A complimentar pel tècnic:

Full de ruta:

Pròxim pas:

Compromisos:



## INFORME DEL COMITÈ ÈTIC D'INVESTIGACIO CLÍNICA

Rosa Morros Pedrós, Presidenta del Comitè Ètic d'Investigació Clínica del l'IDIAP Jordi Gol i Gurina.

### CERTIFICA :

Que aquest Comitè a la reunió del dia 19 de desembre de 2012, després d'avaluar per petició de la Investigadora Principal Montserrat Garcia Vaquer el projecte d'investigació **(P12/115)** titulat: ***Influència de la presència de metalls pesants en el risc litíasi.***

Considera que respecta els requisits ètics de confidencialitat i de bona pràctica clínica vigents.

Barcelona a 7 de gener de 2013.

## INFORMACIÓ PER ALS FACULTATIUS:

### 1. INTRODUCCIÓ

El Centre Grup de Tècniques de Separació en Química, GTS, és un "Grup Consolidat de Recerca de Qualitat" des de 1993, que forma part de TECNIO - xarxa que potencia la tecnologia diferencial, la innovació empresarial i l'excel·lència a Catalunya. El GTS, localitzat a la Universitat Autònoma de Barcelona, investiga diferents àrees del medi ambient, biomedicina, aplicacions agroalimentàries i instrumentació analítica.

En les darreres dècades ha augmentat l'interés en la recerca de la influència de factors ambientals sobre la salut. D'altra banda, s'ha observat un increment en el nombre de persones afectades per la litiasi renal. En aquesta línia, l'objectiu del present estudi és establir una possible relació entre l'exposició a concentracions elevades de metalls tòxics i el desenvolupament d'un càlcul renal.

### 2. INCIDÈNCIA:

Les pedres de ronyó són molt comunes en països industrialitzats, als que aproximadament un 12% de la població desenvoluparà un càlcul renal al llarg de la seva vida, encara que aquestes xifres varien molt en funció de diferents factors, com ara la zona geogràfica, el clima o l'alimentació.

A Espanya, la urolitiasis té una prevalença al voltant del 4% amb una taxa d'incidència del 0,27%, i es produeixen uns 105.000 nous casos cada any. D'aquests, aproximadament una quarta part necessitarà una actuació urològica. L'índex d'incidència més gran es dona entre els 30 i 60 anys, amb un clar predomini en els homes.

A més, s'ha vist una correlació en l'augment de la freqüència de pedres en països desenvolupats i amb l'increment de la riquesa i de la despesa d'aliments per càpita. En el present estudi, es vol estudiar si hi ha una correlació entre els metalls pesants i la formació de pedres de ronyó. Els metalls pesants que s'investiguen són: Zinc (Zn), Plom (Pb), Coure (Cu) i Crom (Cr). Tots ells poden introduir-se al cos humà per la ingesta d'aliments que poden incorporar-los a través de l'aigua o del sòl.

### 3. OBJECTIUS:

- Realitzar un estudi per observar i analitzar la quantitat de metalls pesants en la orina dels habitants de l'àrea exposada de Flix (casos), i comparar-la amb els habitants de fora de l'àrea de Flix (controls), per tal d'averiguar si la zona exposada conté realment més metalls que la zona de fora de l'àrea.
- Avaluar si ha un risc associat a la relació amb metalls pesants i la formació de pedres de ronyó.

### 4. CRITERIS D'INCLUSIÓ DE CASOS I CONTROLS

Els participants han de complir els següents requisits i han d'omplir el formulari inclòs al final d'aquest document.

#### **Criteris d'inclusió dels Casos:**

- Edat entre 30-65 anys
- Residència dintre l'àrea de Flix

**Criteris d'inclusió dels Controls:**

- Edat entre 30-65 anys
- Residència fora de l'àrea de Flix

**Criteris d'exclusió:**

- Incapacitat física per participar en l'estudi.

**5. MOSTRA BIOLÒGICA D'ORINA**

Tant pels casos com pels controls, s'agafarà una mostra d'orina nocturna. En aquesta mostra s'analitzaran els metalls Zn, Pb, Cu i Cd i creatinina per tal de normalitzar els resultats.

**Presa de mostra:** es facilitarà al participant un pot per recollir al voltant de 100 ml. Un cop recollida la mostra s'ha de mantenir congelada o, en cas que no sigui possible, refrigerada.

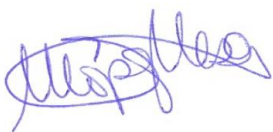
**Material necessari (Proporcionat pel Centre GTS):**

- Pot de recollida d'orina de 100 ml.
- Etiquetes d'identificació de la mostra.
- Formulari

**Processament de mostra:**

El Centre GTS analitzarà totes les mostres i, en cas de requeriment del pacient, se li enviarà una còpia dels resultats.

Bellaterra, 26 de novembre del 2012



Dra. Montserrat López Mesas  
Responsable de l'estudi



Jeroen De Bont  
Tècnic analista

Grup de Tècniques de Separació en Química  
Departament de Química, Unitat de Química Analítica  
Universitat Autònoma de Barcelona  
08193 Bellaterra, Barcelona, Spain

Correu electrònic: Montserrat.lopez.mesas@uab.cat

#### INFORMACIÓ PER ALS PARTICIPANTS:

En les darreres dècades ha augmentat l'interès en la recerca de la influència de factors ambientals sobre la salut. D'altra banda, s'ha observat un increment en el nombre de persones afectades per la litiasi renal. En aquest estudi investiguem la possible relació entre l'exposició a metalls pesants i el desenvolupament d'un càlcul renal.


El nostre grup de recerca, el Grup de Tècniques de Separació en Química, GTS, situat a la Universitat Autònoma de Barcelona, investiga diferents àrees del medi ambient, biomedicina, aplicacions agroalimentàries i instrumentació analítica.

El voluntari participarà en l'estudi proporcionant una mostra d'orina, en la que seran analitzats els metalls pesants Zinc (Zn), Plom (Pb), Coure (Cu) i Crom (Cr) així com creatinina i que es farà servir per avaluar el seu risc litogen. Aquesta presa de mostra no representa cap risc per a la salut ni cap inconvenient per al pacient.

El pacient no obtindrà un benefici econòmic per l'estudi però si ajudarà a entendre millor els processos ambientals que poden afectar a la salut. El Centre GTS analitzarà totes les mostres i, en cas de requeriment del pacient, se li enviarà una còpia dels resultats.

Segons les Llei Orgànica 15/1999, de 13 de desembre, de Protecció de Dades de Caràcter Personal, l'estudi plantejat té exclusivament caràcter científic i en cap moment interès comercial. A més, l'estudi és totalment confidencial i només tindran accés a les dades els investigadors implicats en el mateix.

Moltes gràcies per participar en el present estudi.



Dra. Montserrat López Mesas

Grup de Tècniques de Separació en Química  
Departament de Química, Unitat de Química Analítica  
Universitat Autònoma de Barcelona  
08193 Bellaterra, Barcelona, Spain

Correu electrònic: [Montserrat.lopez.mesas@uab.cat](mailto:Montserrat.lopez.mesas@uab.cat)



## FORMULARI DE PARTICIPACIÓ A L'ESTUDI DE CÀLCULS RENALS

Codi Pacient

Flix- X

### Dades del pacient:

Edat:

Vostè es de l'àrea de Flix? ☐ Sí ☐ No

En cas negatiu, si us plau indiqui d'on és:

Ha patit algun episodi de pedres de ronyó? ☐ Sí ☐ No

En cas afirmatiu, si us plau, indiqui quants:

Pren alguna medicació? ☐ Sí ☐ No Quina?

Data d'entrega de la mostra:

Està interessat en rebre el resultat de les anàlisis? ☐ Sí ☐ No

En cas afirmatiu, si us plau, indiqui la seva adreça postal o electrònica:

## CONSENTIMENT INFORMAT

### El pacient declara que:

1. Participa voluntàriament a l'estudi.
2. Respon lliurement a aquest formulari.
3. Accedeix a recollir i entregar l'orina acumulada donant el període nocturn (0h-8h aproximadament).
4. Ha estat informat dels mètodes i objectius generals de la investigació.

### L'equip de recerca declara que:

1. Mantindrà l'anonimat de les persones que han participat en aquesta recerca, i la confidencialitat de les dades que se'n derivin.
2. Les dades obtingudes només s'utilitzaran amb finalitat científica.
3. En cas que els participants ho desitgin, seran informats dels objectius concrets i dels resultats de la investigació, una vegada hagi finalitzat.

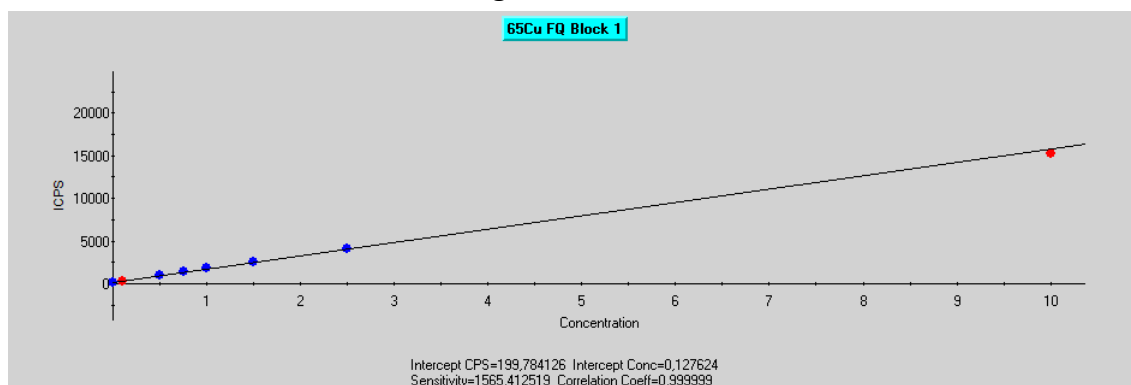
Data:

Dra. Montserrat López Mesas  
L'equip de recerca

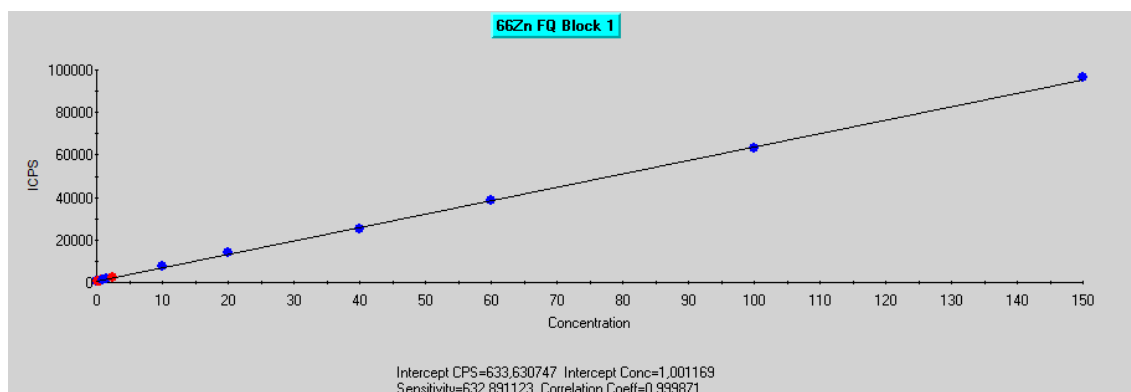
Signatura del participant

Moltes gràcies per la seva participació!

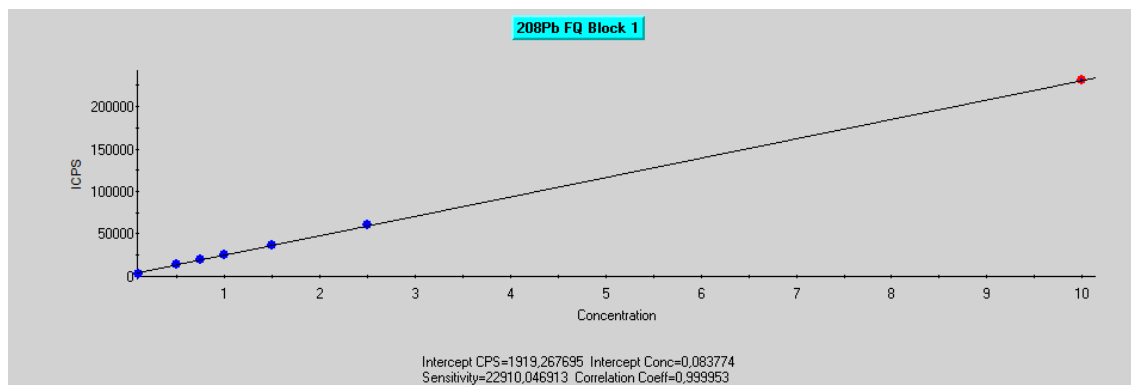
## 6.2. Resultats: rectes de regressió



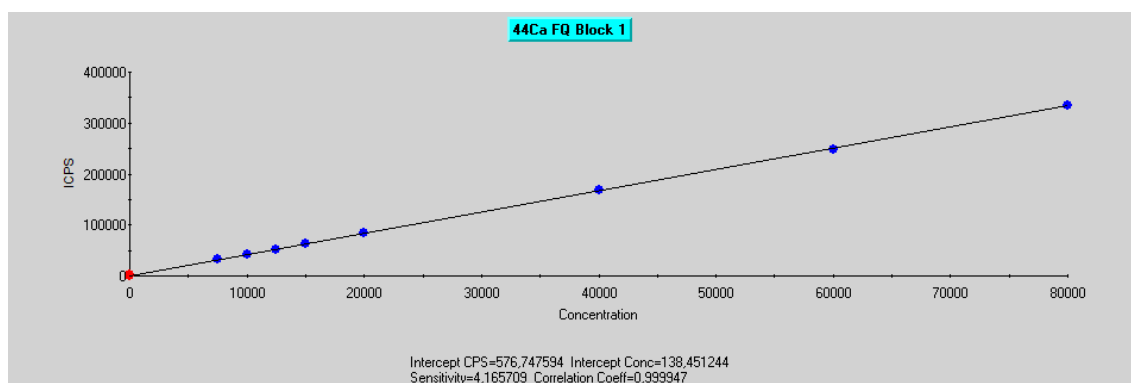
**Figura 1:** recta de calibratge de coure.



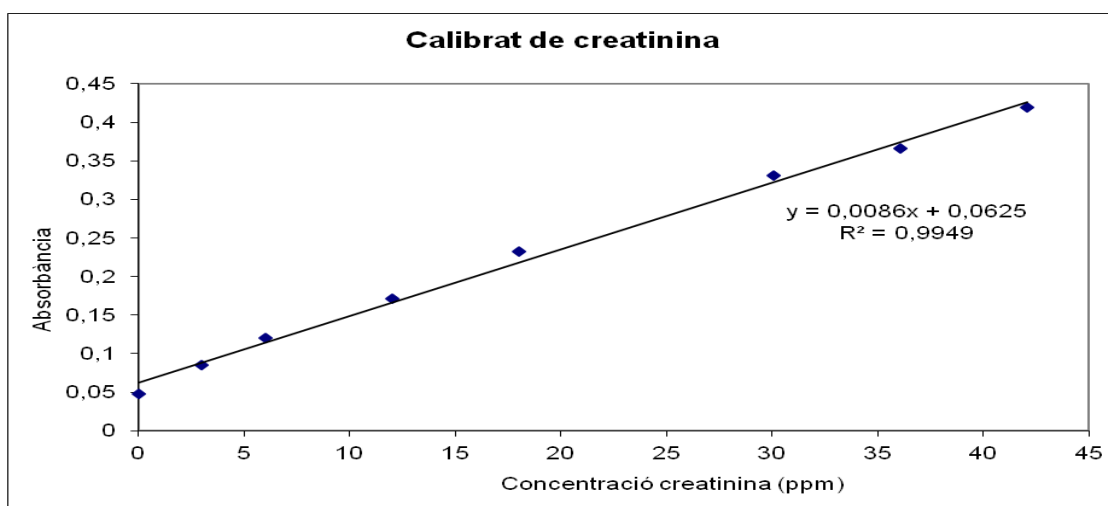
**Figura 2:** recta de calibratge de zinc



**Figura 3:** recta de calibratge de plom



**Figura 4:** recta de calibratge de calci



**Figura 5:** recta de calibratge de creatinina

### 6.3. Resultats: taules de dades

#### Incubacions amb orines artificials.

**Taula 1:** Càlculs de les orines artificials afegint metalls i oxalat de calci.

Tipus d'incubació	Element	ppb afegit a la mostra	ppb detectat després de la incubació	Ca detectat (ppm)	% de pèrdua	% influència metall
Individual	Zn	490,33	309,36	17,86	36,91	7,986
		490,33	311,06	17,38	36,56	10,467
Individual	Pb	19,69	4,90	18,73	75,11	3,513
		19,69	7,54	17,52	61,70	9,751
Individual	Cu	26,77	19,92	19,82	25,59	-2,114
		26,77	23,19	18,98	13,38	2,183
3 metalls junts	Zn	465,82	362,16	16,42	22,25	15,413
	Pb	18,76	5,74	16,42	69,41	15,413
	Cu	25,36	16,52	16,42	34,84	15,413
3 metalls junts	Zn	465,82	414,46	17,70	11,02	8,802
	Pb	18,76	8,23	17,70	56,14	8,802
	Cu	25,36	21,61	17,70	14,77	8,802

**Taula 2:** Càlculs de les orines artificials afegint metalls i hidroxipatita.

Tipus d'incubació	Element	ppb afegit a la mostra	ppb detectat després de la incubació	Ca detectat (ppm)	% de pèrdua	% influència metall
Individual	Zn	490,330	<LOD	16,488	100,000	8,313
		490,330	<LOD	16,848	100,000	6,312
Individual	Pb	19,686	<LOD	18,726	100,000	-4,132
		19,686	<LOD	17,515	100,000	2,600
Individual	Cu	26,774	<LOD	20,818	100,000	-15,766
		26,774	<LOD	17,984	100,000	-0,008
3 metalls junts	Zn	465,816	<LOD	16,417	100,000	8,710
	Pb	18,764	<LOD	16,417	100,000	8,710
	Cu	25,356	<LOD	16,417	100,000	8,710
3 metalls junts	Zn	465,816	<LOD	17,700	100,000	1,575
	Pb	18,764	<LOD	17,700	100,000	1,575
	Cu	25,356	<LOD	17,700	100,000	1,575

## Incubacions amb orines reals

**Taula 3:** Càlculs de les orines reals afegint zinc en COM i HAP

Codi	Creatinina (g/l)	Blanc sense incubar		Blanc incubat		HAP Blanc sense Zn		HAP amb Zn		Oxalat Blanc sense Zn		Oxalat amb Zn	
		Ca (mg/gCr)	Zn (ug/gCr)	Ca (mg/gCr)	Zn (ug/gCr)	Ca (mg/gCr)	Zn (ug/gCr)	Ca (mg/gCr)	Zn (ug/gCr)	Ca (mg/gCr)	Zn (ug/gCr)	Ca (mg/gCr)	Zn (ug/gCr)
A	1,097	777,456	585,303	454,587	500,985	533,527	87,754	526,417	132,63	469,992	476,373	439,820	683,248
B	0,706	399,542	812,822	320,370	613,688	296,717	138,31	286,520	184,26	310,314	606,182	302,949	911,893
C	0,549	305,614	981,315	274,470	846,357	144,556	21,145	118,913	26,154	234,947	763,670	228,482	1147,782
D	1,139	137,209	228,857	44,551	153,449	33,604	0,000	35,764	10,034	32,586	128,167	35,874	319,188
E	1,312	209,697	152,548	172,360	109,420	158,949	8,351	155,672	21,145	162,073	114,678	189,276	319,574
F	0,632	104,651	392,519	122,440	355,494	120,103	0,000	131,179	12,039	80,418	310,456	83,853	627,780
G	1,040	85,641	173,917	78,421	120,175	84,459	9,028	85,738	30,659	51,973	121,232	52,151	346,536
I	1,152	63,343	297,348	123,403	509,503	116,716	477,37	136,255	64,558	94,050	465,648	92,617	670,639
J	1,698	125,438	237,508	115,426	194,046	99,997	20,777	94,167	29,198	99,467	187,980	98,230	302,082
K	0,876	174,413	331,591	153,182	526,893	156,378	28,776	151,699	12,282	128,071	508,744	129,098	257,967
L	1,554	107,617	353,037	83,738	264,472	82,644	30,959	82,193	54,008	69,063	259,066	68,902	406,009
M	0,258	2299,39	1037,088	683,395	599,035	551,437	58,859	567,690	30,764	557,629	547,954	570,205	1485,978
N	0,964	115,919	333,657	103,901	259,327	89,582	24,828	98,363	42,645	82,189	269,808	83,223	502,508
P	0,425	105,026	284,020	101,617	186,024	44,084	0,000	53,512	30,048	52,854	154,942	48,457	675,019
Q	0,752	107,491	322,725	106,454	289,494	112,370	11,175	106,889	20,565	76,821	274,765	76,856	583,733
R	1,026	79,165	89,591	60,429	53,413	28,344	11,039	29,766	31,364	35,203	59,347	34,877	164,513
S	0,681	118,844	352,849	110,155	234,548	82,062	12,872	79,406	9,746	81,079	236,309	76,074	559,583

Cas estudi: Flix

**Taula 4:** Resultats obtinguts al analitzar la creatinina i els metalls pesants en l'orina dels controls.

<b>Códi</b>	<b>Creatinina (g/l)</b>	<b>Ca(mg/g creat)</b>	<b>Cu (ug/g creat)</b>	<b>Zn (ug/g creat)</b>	<b>Pb (ug/g creat)</b>
<b>UAB-1</b>	1,026	79,165	19,000	89,591	3,098
<b>UAB-2</b>	0,876	174,413	25,283	331,591	3,949
<b>UAB-3</b>	0,752	107,491	17,705	322,725	<LOQ
<b>UAB-4</b>	0,549	305,614	47,244	981,315	8,232
<b>UAB-5</b>	1,698	125,438	11,578	237,508	1,973
<b>UAB-6</b>	0,258	2299,395	63,851	1037,088	23,799
<b>UAB-7</b>	0,964	115,919	14,298	333,657	4,500
<b>UAB-8</b>	0,425	105,026	28,284	284,020	5,690
<b>UAB-10</b>	1,097	777,456	21,722	585,303	4,312
<b>UAB-11</b>	0,706	399,542	23,737	812,822	10,665
<b>UAB-12</b>	0,199	597,277	40,858	673,761	<LOQ
<b>UAB-13</b>	1,139	137,209	14,467	228,857	<LOQ
<b>UAB-14</b>	1,312	209,697	11,666	152,548	<LOQ
<b>UAB-15</b>	0,632	104,651	19,404	392,519	6,426
<b>UAB-16</b>	1,040	85,641	17,392	173,917	7,307
<b>UAB-17</b>	1,362	200,901	15,794	391,301	3,826
<b>UAB-18</b>	1,152	63,343	6,366	297,348	<LOQ
<b>UAB-19</b>	0,978	183,894	14,812	133,908	4,395
<b>UAB-20</b>	1,591	87,001	14,056	404,078	3,061
<b>UAB-21</b>	0,991	147,882	11,730	389,338	4,633
<b>UAB-22</b>	0,681	118,844	13,166	352,849	5,357
<b>UAB-23</b>	0,811	185,396	13,140	389,899	8,247
<b>UAB-24</b>	1,226	182,418	11,128	225,412	5,988
<b>UAB-25</b>	1,554	107,617	11,927	353,037	2,510
<b>UAB-26</b>	1,869	34,063	9,031	268,565	3,135
<b>UAB-27</b>	0,861	374,914	15,301	215,631	5,472
<b>UAB-28</b>	0,644	229,280	17,541	212,360	8,569
<b>UAB-29</b>	1,826	104,826	9,727	203,847	2,738
<b>UAB-30</b>	1,145	140,222	10,285	197,062	3,396
<b>UAB-31</b>	0,502	302,455	21,499	409,650	<LOQ
<b>UAB-32</b>	0,341	709,315	45,157	897,566	<LOQ
<b>UAB-33</b>	1,356	271,155	10,806	648,825	5,016
<b>UAB-34</b>	1,380	671,576	8,299	393,698	<LOQ
<b>UAB-35</b>	1,033	185,443	17,256	707,394	<LOQ
<b>Mitja</b>	0,999	291,896	19,221	403,794	5,852
<b>SD*</b>	0,433	402,774	12,546	246,354	4,320
<b>Interval</b>	(0,199-1,869)	(34,063-2299,395)	(6.366-63,851)	(89,591-1037,088)	(1,973-23,799)

\*SD= desviació estàndard

**Taula 5:** Resultats obtinguts al analitzar la creatinina i els metalls pesants en l'orina dels casos de Flix.

<b>Códi</b>	<b>Creatinina (g/l)</b>	<b>Ca(mg/g creat)</b>	<b>Cu (ug/g creat)</b>	<b>Zn (ug/g creat)</b>	<b>Pb (ug/g creat)</b>
<b>Flix-1</b>	0,992	245,320	17,064	685,365	28,866
<b>Flix-2</b>	0,963	261,511	14,524	562,056	4,651
<b>Flix-3</b>	1,837	102,955	9,305	358,683	3,653
<b>Flix-4</b>	1,368	169,570	13,704	998,414	5,241
<b>Flix-5</b>	1,750	239,264	11,195	376,296	3,074
<b>Flix-6</b>	0,327	269,006	29,026	532,506	12,204
<b>Flix-7</b>	1,258	134,630	14,019	303,673	8,456
<b>Flix-8</b>	0,795	257,701	18,127	339,034	6,801
<b>Flix-9</b>	0,819	67,698	13,352	294,271	8,074
<b>Flix-10</b>	0,292	272,861	32,611	696,352	18,307
<b>Flix-11</b>	0,761	125,817	11,738	285,099	<LOQ
<b>Flix-12</b>	1,079	217,343	11,483	120,767	3,726
<b>Flix-13</b>	1,281	139,379	10,769	301,311	2,591
<b>Flix-14</b>	1,102	168,137	12,821	301,703	2,858
<b>Flix-15</b>	0,986	86,193	12,237	378,249	4,451
<b>Flix-16</b>	0,738	398,021	13,163	191,283	4,813
<b>Flix-20</b>	0,749	67,097	11,692	255,199	4,365
<b>Flix-22</b>	1,229	260,709	17,465	543,056	5,605
<b>Flix-23</b>	0,981	266,469	21,925	384,559	3,630
<b>Flix-24</b>	1,206	453,987	5,206	410,545	<LOQ
<b>Flix-26</b>	0,477	175,890	12,884	90,501	<LOQ
<b>Flix-27</b>	1,403	224,396	5,524	439,311	<LOQ
<b>Flix-29</b>	1,611	216,992	7,014	116,751	2,514
<b>Flix-30</b>	0,969	152,214	8,854	275,739	<LOQ
<b>Flix-31</b>	0,414	378,765	8,484	336,223	<LOQ
<b>Flix-32</b>	0,639	249,800	7,352	724,842	<LOQ
<b>Flix-33</b>	0,853	198,982	9,668	256,521	3,785
<b>Flix-34</b>	0,842	255,770	7,722	400,940	<LOQ
<b>Flix-35</b>	0,587	555,810	24,300	927,372	<LOQ
<b>Flix-36</b>	0,518	175,751	9,173	254,135	<LOQ
<b>Flix-37</b>	1,374	187,998	7,671	154,663	<LOQ
<b>Flix-38</b>	0,454	261,996	8,102	212,635	<LOQ
<b>Flix-39</b>	0,188	310,449	<LOQ	860,114	<LOQ
<b>Flix-40</b>	0,824	204,993	6,890	524,248	7,181
<b>Flix-41</b>	0,205	78,114	22,339	880,427	<LOQ
<b>Flix-59</b>	1,200	87,053	6,339	268,490	<LOQ
<b>Mitja</b>	0,919	219,962	12,964	417,815	6,897
<b>SD*</b>	0,420	107,411	6,509	237,590	6,248
<b>Interval</b>	(0,188-1,837)	(67,097-555,810)	(5,206-32,611)	(90,501-998,414)	(2,514-28,866)

\*SD=desviació estàndard

**Taula 6: Resultats obtinguts al analitzar la creatinina i els metalls pesants en l'orina dels voluntaris amb càlculs renals, tant pels casos com controls**

<b>Codi (Controls)</b>	<b>Creatinina (g/l)</b>	<b>Ca(mg/g creat)</b>	<b>Cu (ug/g creat)</b>	<b>Zn (ug/g creat)</b>	<b>Pb (ug/g creat)</b>
<b>UAB-3</b>	0,752	107,491	17,705	322,725	0,000
<b>UAB-17</b>	1,362	200,901	15,794	391,301	3,826
<b>UAB-18</b>	1,152	63,343	6,366	297,348	0,000
<b>UAB-21</b>	0,991	147,882	11,730	389,338	4,633
<b>UAB-25</b>	1,554	107,617	11,927	353,037	2,510
<b>UAB-30</b>	1,145	140,222	10,285	197,062	3,396
<b>Mitja</b>	1,159	127,909	12,301	325,135	2,394
<b>SD*</b>	0,280	46,639	4,029	72,745	1,977
<b>Interval</b>	(0,752-1,554)	(63,343-200,901)	(6,366-17,705)	(197,062-391,301)	(0-4,633)
<b>Codi (Casos)</b>	<b>Creatinina (g/l)</b>	<b>Ca(mg/g creat)</b>	<b>Cu (ug/g creat)</b>	<b>Zn (ug/g creat)</b>	<b>Pb (ug/g creat)</b>
<b>Flix-2</b>	0,963	261,511	14,524	562,056	4,651
<b>Flix-4</b>	1,368	169,570	13,704	998,414	5,241
<b>Flix-13</b>	1,281	139,379	10,769	301,311	2,591
<b>Flix-16</b>	0,738	398,021	0,000	191,283	4,813
<b>Flix-24</b>	1,206	453,987	0,000	410,545	0,000
<b>Flix-35</b>	0,587	555,810	24,300	927,372	0,000
<b>Mitja</b>	1,024	329,713	10,550	565,164	2,882
<b>SD*</b>	0,314	165,985	9,354	332,332	2,413
<b>Interval</b>	(0,587-1,368)	(139,379-555,810)	(0-24,300)	(191,283-998,414)	(0-5,241)

\*SD= desviació estàndard